

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA



**INTEGRACIÓN EN LA RUTINA DIAGNÓSTICA DE
LA CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS
TUMORES GLIALES**

TESIS DOCTORAL

LINA DAOUD

DIRECTOR: DR. FEDERICO ROJO TODO

Madrid, 2017

INTEGRACIÓN EN LA RUTINA DIAGNÓSTICA DE LA CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS TUMORES GLIALES

Memoria de Tesis Doctoral presentada por
Lina Daoud para aspirar al título de Doctor por la

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Dpto. de ANATOMÍA PATOLÓGICA

Programa de doctorado en
Medicina y Cirugía

Doctorando: Lina Daoud

Director: Dr. Federico Rojo Todo

Tutor: Dr. José Román Fortes Alen

Fundación Jiménez Díaz
Departamento de Anatomía Patológica

AGRADECIMIENTOS:

Sería imposible expresar suficientemente mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible, de alguna forma, la realización de esta tesis doctoral.

Al Dr. Federico Rojo, gracias por brindarme la oportunidad y poner a mi disposición todos los medios y facilidades haciendo posible con tu dirección y ayuda la realización de este trabajo. Gracias por introducirme en el mundo de la investigación y por todo lo que he aprendido a tu lado estos años.

Gracias al Dr. Sarasa por todo lo que me has enseñado desde mi primer año de residencia, por confiar siempre en mí y por descubrirme mi pasión por la neuropatología.

Gracias al Dr. Fortes, por tu apoyo y por permitirme continuar a tu lado mi aprendizaje en la neuropatología.

Gracias a todos los adjuntos, compañeros de residencia y técnicos del servicio de Anatomía Patológica con los que me he formado y compartido todos estos años.

Gracias a los departamentos de patología molecular e inmunohistoquímica por vuestra ayuda, apoyo, disposición y todo lo que he aprendido con vosotros, esta tesis es vuestra también.

Por último gracias a mi familia, mi gran apoyo en los malos y buenos momentos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. GLIOMAS DIFUSOS. INTRODUCCIÓN.	7
1.1. DEFINICIÓN.....	7
1.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	7
1.3. CLÍNICA.....	8
1.4. DIAGNÓSTICO RADIOLÓGICO.....	9
1.5. TRATAMIENTO.....	15
2. GLIOMAS DIFUSOS. CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA.....	19
2.1. CLASIFICACIONES HISTOLÓGICAS.....	19
2.2. CLASIFICACIÓN DE LA OMS.....	20
2.3. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LOS GLIOMAS DIFUSOS.....	21
3. GLIOMAS DIFUSOS. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS CLÁSICOS.....	26
3.1. TIPO HISTOLÓGICO.....	26
3.2. GRADO HISTOLÓGICO.....	26
3.3. MARCADORES DE PROLIFERACIÓN.....	28
4. GLIOMAS DIFUSOS. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	29
4.1. ALTERACIONES DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR.....	29
4.2. BIOMARCADORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS DE USO CLÍNICO PARA EL MANEJO DE LOS PACIENTES.....	34
4.3. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS GLIOMAS DIFUSOS.....	42
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	45
MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
1. SELECCIÓN DE LOS CASOS Y RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS.....	51
2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	51
3. HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH).....	53
4. PIROSECUENCIACIÓN.....	54
4.1. ESTUDIO DE MUTACIÓN DE IDH1.....	54
4.2. ESTUDIO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN DE MGMT.....	56
4.3. DETECCIÓN DE EGFRVIII.....	57

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	59
<i>RESULTADOS</i>	61
1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA DE LA SERIE.	63
2. ASOCIACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS.	64
2.1. EDAD Y SEXO.	65
2.2. LOCALIZACION.	66
2.3. TRATAMIENTO.	66
2.4. SUPERVIVENCIA.	68
3. ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN MEDIANTE KI67.	69
4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.	71
4.1. MUTACIÓN DE IDH1.	71
4.2. CODELECIÓN 1P19Q.	79
4.3. EXPRESIÓN DE P53.	81
4.4. EXPRESIÓN DE ATRX.	84
4.5. AMPLIFICACIÓN DE EGFR Y PRESENCIA DE EGFRvIII.	87
4.6. METILACIÓN DE MGMT.	90
4.7. RESUMEN DE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.	93
5. FACTORES PRONÓSTICOS.	95
5.1. PARÁMETROS CLÍNICOS.	95
5.2. PARÁMETROS HISTOLÓGICOS.	99
5.3. ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN.	102
5.4. PARÁMETROS MOLECULARES.	103
6. RESPUESTA A TRATAMIENTO.	112
7. SUBTIPOS MOLECULARES.	115
7.1. ASOCIACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS MOLECULARES.	115
7.2. CLASIFICACIÓN MOLECULAR.	121
7.3. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE SUPERVIVENCIA	123
<i>DISCUSIÓN</i>	127
<i>CONCLUSIONES</i>	143
<i>RESUMEN</i>	147
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	151

ABREVIATURAS

18FDG	18 fluorodesoxiglucosa	ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
A	Adenina	FDA	Agencia de medicamentos y alimentos
AA	Astrocitoma anaplásico	FFPE	Fijado en formaldehído e incluido en parafina
AD	Astrocitoma difuso	FISH	Hibridación fluorescente in situ
ADC	Coeficiente de difusión aparente	FLAIR	Recuperación de la inversión atenuada de fluido
ADN	Ácido desoxirribonucleico	FUBP1	Del inglés, Far upstream element binding protein 1
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario	G	Guanina
ALT	Alargamiento alternativo de los telómeros	GBM	Glioblastoma
ARN	Ácido ribonucleico	G-CIMP	Glioma con fenotipo metilador de islas CpG
ATP	Adenosina trifosfato	Grb2	Proteína ligadora del receptor del factor de crecimiento 2
ATRX	Síndrome alfa-talasemia con retraso mental ligado al cromosoma X	HIF-1α	Factor inducible por hipoxia
BCNU	Bis-chloroethylnitrosourea	IDH	Isocitrato deshidrogenasa
Btn	Biotina	JAK	Quinasa Janus
C	Citosina	LA	Lactato
CDK	Quinasa dependiente de ciclina	MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
CDKN	Inhibitor de quinasa dependiente de ciclina	MDM	Doble minuto murino
Cho	Colina	MEK	Proteína MAP quinasa quinasa
CIC	Del inglés, Capicua Transcriptional Repressor	MGMT	O6-metilguanina- DNA metiltransferasa
DAB	Diaminobenzidina	MKP	Proteína fosfatasa de MAP quinasa
DAG	Diacylglicerol	mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	NAA	N-acetil-aspartato
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	NCIC	Instituto nacional del cáncer de Canadá
EGFRvIII	Receptor de factor de crecimiento epidérmico variante III	NOS	No especificado en otra categoría
EORTC	Organización europea de investigación y tratamiento del cáncer	O	Oligodendroglioma

OA	Oligodendroglioma anaplásico	Rb	Retinoblastoma
OMS	Organización mundial de la salud	RM	Resonancia magnética
PCNA	Antígeno nuclear celular proliferativo	RTK	Receptor tirosina quinasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	RTOG	Grupo de radioterapia oncológica
PCV	Procarbazina, Lomustina y Vincristina	SG	Supervivencia global
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	SLP	Supervivencia libre de progresión
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas	SNC	Sistema nervioso central
PET	Tomografía por emisión de positrones	SPECT	Tomografía por emisión de fotón único
PHH3	Fosfohistona 3	STAT	Transductores de señales y activadores de la transcripción
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa	T	Timina
PIK3CA	Subunidad catalítica de PI3K	TC	Tomografía computarizada
PIP2	Fosfatidilinositol 3,4 difosfato	TCGA	Atlas de genoma del cáncer
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato	TERT	Telomerasa transcriptasa inversa
PKC	Proteína quinasa C	U	Uracilo
PLC	Fosfolipasa C	VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
PTEN	Homólogo de tensina y fosfatasa	VScr	Volumen sanguíneo cerebral relativo

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. GLIOMAS DIFUSOS. INTRODUCCIÓN.

1.1. DEFINICIÓN.

Los gliomas infiltrantes o gliomas difusos incluyen los astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas o gliomas mixtos [1]. En conjunto, suponen las neoplasias más frecuentes del sistema nervioso central (SNC) [2]. En 1926, Bailey y Cushing fueron los primeros en describir estos tumores por sus patrones de diferenciación celular [3]. A lo largo de las siguientes décadas, esta primera descripción ha ido mejorando gracias a la inclusión de los detalles histológicos para la gradación y el pronóstico de estas entidades.

Actualmente la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es el estándar internacional empleado para la gradación y clasificación de los gliomas difusos. Recientemente, se publicó la última clasificación en la que además de los criterios histológicos, incorpora parámetros moleculares para definir estas entidades.

Histológicamente los gliomas difusos se dividen en astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas con un espectro continuo de malignidad determinado por el grado histológico y por los marcadores moleculares incluidos en la clasificación del 2016.

Clínicamente, estos tumores siguen siendo igual de agresivos que cuando se describieron por primera vez, y esto se debe en gran parte a su carácter invasivo, a su tendencia a la progresión y a su resistencia a las terapias adyuvantes convencionales.

Hasta hace poco, el diagnóstico de los gliomas difusos se basaba únicamente en el estudio histológico de la tinción con Hematoxilina-Eosina suponiendo un gran reto para el neuropatólogo. La incorporación de los estudios moleculares permite proporcionar un diagnóstico más reproducible con el fin de mejorar el manejo terapéutico de los pacientes con glioma.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA.

Los astrocitomas infiltrantes (grado II-IV) comprenden el 72% de los tumores primarios malignos del SNC con una incidencia anual de 3.3 a 5/100.000 persona-años [4], son ligeramente más frecuentes en varones con una proporción de 1.3:1. Pueden manifestarse a cualquier edad, sin embargo la incidencia incrementa sustancialmente

con la edad siendo los gliomas de alto grado, especialmente los glioblastomas, más comunes en pacientes mayores [2].

Los astrocitomas difusos (grado II) representan entre el 5 y el 10% de los astrocitomas infiltrantes, con un pico de incidencia entre los 30 y 40 años. Los astrocitomas anaplásicos (grado III) representan alrededor del 10% y afectan principalmente a pacientes a mediados de los 40 años [2].

Los glioblastomas (grado IV) son los más frecuentes entre estos tumores, pueden desarrollarse a partir de astrocitomas grado II y III (glioblastomas secundarios, 10%), aunque en un 90% de los casos ocurren de novo (glioblastomas primarios) [2].

Los oligodendrogliomas representan un 4% de los tumores primarios cerebrales y entre el 15 y el 25% de los gliomas infiltrantes. La incidencia anual es de 0.32 a 0.42/100.000 persona-años y son también ligeramente más frecuentes en varones (3:2). Se presentan predominantemente en adultos jóvenes y de mediana edad con un pico de incidencia en pacientes de 30 y 40 años. Los oligodendrogliomas son muy raros en niños por razones hasta ahora desconocidas [2].

La incidencia de los oligoastrocitomas solo se puede estimar debido a que este tipo histológico depende principalmente de criterios histopatológicos para establecer el diagnóstico, que difiere considerablemente entre los patólogos. En series largas publicadas, estos tumores suponen entre el 5 y el 20% de los gliomas difusos. La incidencia anual es de 0.4/100.000 persona-años. Ocurren generalmente en adultos con un pico de incidencia durante la década de los 30 y 40 años y un ligero predominio en varones (3:2) [2].

1.3. CLÍNICA.

Generalmente los gliomas cerebrales debutan con síntomas inespecíficos secundarios al aumento de la presión intracraneal y compresión del tejido cerebral, como la cefalea, alteraciones de las funciones cognitivas, náuseas y vómitos. También pueden ocasionar síntomas focales en función de su localización como por ejemplo las crisis convulsivas.

La cefalea es el síntoma de presentación más frecuente en los tumores gliales [5], aproximadamente un 56% de los pacientes debuta con cefalea, aunque habitualmente se acompaña de otros síntomas como las crisis comiciales, alteraciones visuales o náuseas y vómitos.

Las náuseas y vómitos se manifiestan generalmente asociados a otros síntomas y son secundarios a la hipertensión intracraneal o a la estimulación directa de los centros eméticos próximos al cuarto ventrículo.

La disfunción cognitiva es un trastorno muy común en los gliomas de bajo grado [6], entre sus síntomas se incluyen alteraciones de la memoria, atención, orientación, lenguaje y personalidad.

Las crisis comiciales son más comunes en los gliomas de bajo grado, si bien el 18% de los pacientes con glioblastoma presentan crisis comiciales [6]. El tipo de crisis y la sintomatología neurológica asociada depende de la localización del tumor.

En la siguiente tabla se reflejan las principales manifestaciones clínicas focales en función de la región cerebral afectada por el tumor (Tabla I.1).

LOCALIZACIÓN	SIGNOS Y SÍNTOMAS
Lóbulo frontal	Demencia, trastornos de la personalidad, alteraciones de la marcha, afasia de expresión y crisis comiciales.
Lóbulo parietal	Afasia de comprensión, pérdida sensorial, hemianopsia y desorientación espacial.
Lóbulo temporal	Crisis comiciales parciales o generalizadas, alteraciones del comportamiento, pérdida de la memoria y cuadrantanopsia.
Lóbulo occipital	Hemianopsia contralateral.
Tálamo	Pérdida sensorial contralateral, alteraciones del comportamiento y del lenguaje.

Tabla I. 1. Resumen de los síntomas focales en función de la localización tumoral.

1.4. DIAGNÓSTICO RADIOLÓGICO.

Actualmente, la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) son los principales métodos diagnósticos no invasivos más empleados ante la sospecha clínica de un tumor cerebral.

1.4.1. TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA (TC).

Es el estudio inicial en los pacientes con afección intracraneal y ha sido durante años la técnica más empleada para la detección y caracterización de las lesiones expansivas intracraneales. En la actualidad, ha sido sustituida por la RM y su utilidad se reserva para realizar una primera aproximación diagnóstica, para la valoración de los efectos de masa y detección de calcificaciones y áreas de sangrado agudo. Además, junto con otras técnicas como la RM, se emplea como guía para planificar las biopsias estereotácticas.

1.4.2. RESONANCIA MAGNÉTICA (RM).

Entre las ventajas de la RM destacan el hecho de no usar radiación ionizante ni medios de contraste yodados y la posibilidad de realizar cortes en múltiples planos [7].

En el momento actual, la RM es la técnica de elección para el estudio de la patología tumoral cerebral, y en concreto, de los gliomas. Tiene una alta sensibilidad a las variaciones del contenido de agua en el parénquima cerebral, esto permite detectar de

forma precoz el edema que acompaña a los procesos gliales. Presenta mayor resolución y contraste de los tejidos blandos proporcionando una delimitación más precisa de la extensión tumoral. Además aporta mayor información sobre la caracterización tisular intrínseca de los tumores como por ejemplo la capacidad de detección de necrosis en los glioblastomas [7].

Ante la sospecha de una lesión expansiva intracraneal, en primer lugar se realiza un estudio de RM empleando las secuencias convencionales (T1, T1 con contraste, T2 y T2 FLAIR) en los 3 planos de corte (axial, coronal y sagital) que se irá complementando con otras técnicas o modalidades de imagen según los hallazgos y el contexto.

Generalmente los gliomas son hipointensos en T1 e hiperintensos en T2 y FLAIR, los gliomas anaplásicos pueden mostrar aislados focos de realce de contraste y los glioblastomas se presentan como masas heterogéneas con un patrón característico de captación de contraste en anillo y necrosis central (Figura I.1) [8].

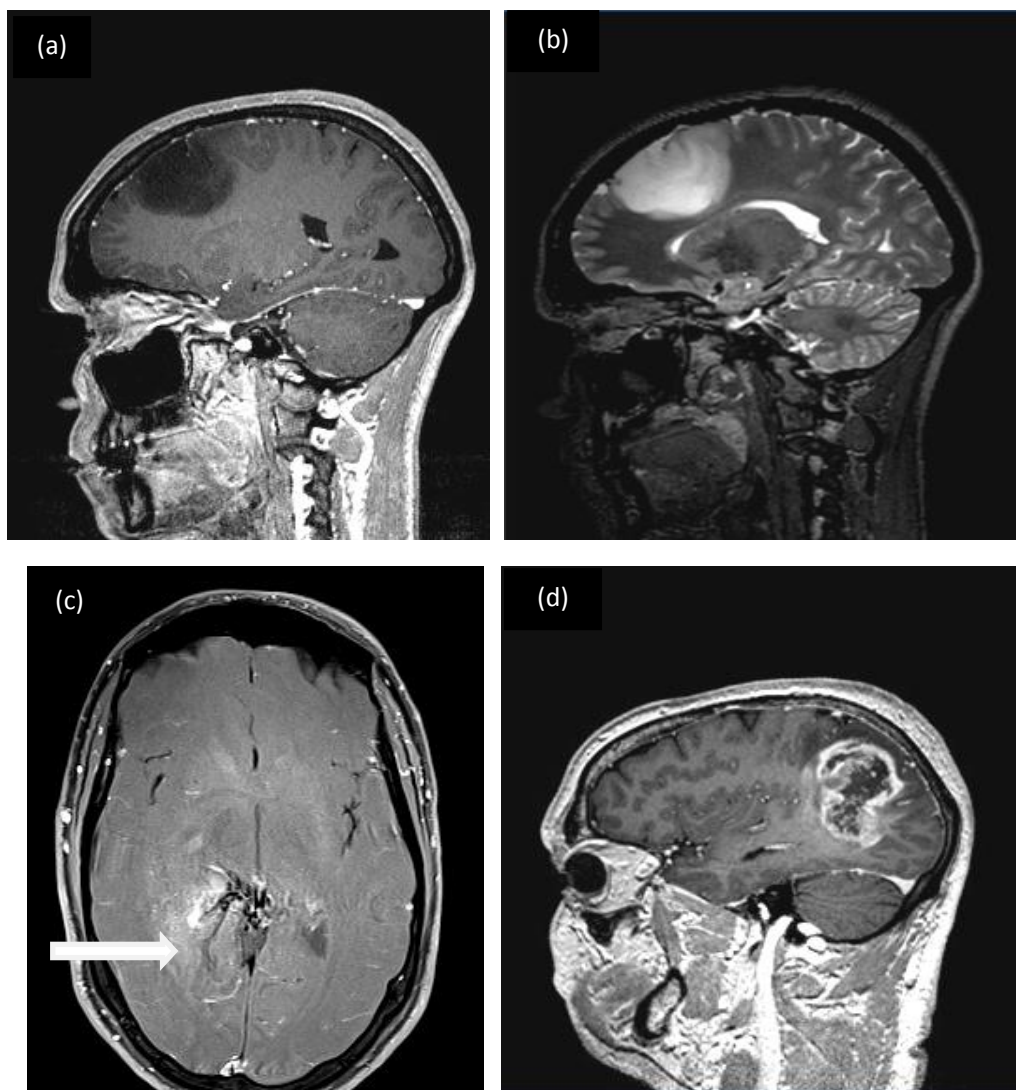


Figura I. 1. a).Glioma de bajo grado, secuencia T1, b) Glioma de bajo grado, secuencia T2, c) Astrocitomas anaplásico, foco de captación de contraste (flecha), d) Glioblastoma multiforme, secuencia T1 con contraste, captación de contraste en anillo.

1.4.3. SECUENCIAS FUNCIONALES DE RESONANCIA MAGNÉTICA.

- **DIFUSIÓN:**

La difusión por RM proporciona imágenes basadas en la medición del movimiento aleatorio de las moléculas de agua. Para cuantificar la difusión se emplea el coeficiente aparente de difusión o mapa ADC [9].

Los procesos en los cuales el movimiento del agua está restringido, como en el caso de los infartos cerebrales, abscesos o tumores con alta densidad celular, muestran hiperintensidad en difusión que se corresponde con hiposeñal en el mapa ADC [9].

En la patología tumoral cerebral, esta secuencia funcional permite valorar la celularidad y el grado tumoral, el edema peritumoral, la integridad de los tractos nerviosos y la lesión postoperatoria (Figura I.2) [10].

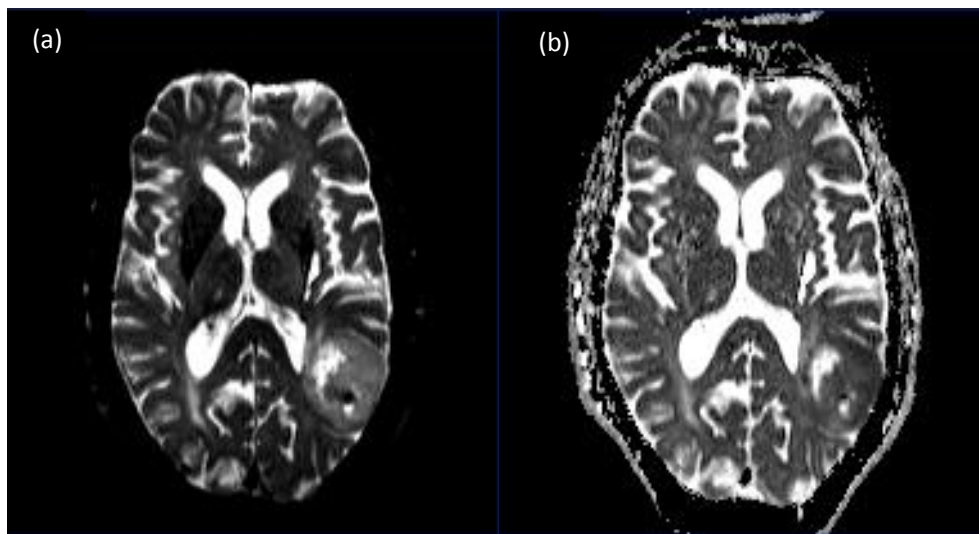


Figura 1.2. Glioblastoma multiforme, a) estudio de difusión, b) mapa ADC.

- **RESONANCIA POR ESPECTROSCOPIA:**

La espectroscopia por RM permite analizar los principales metabolitos de un tejido que se representan en un gráfico espectral.

Es una herramienta muy útil en el diagnóstico y la gradación de los gliomas cerebrales, para lo cual se valoran los siguientes metabolitos:

Colina (Cho): Metabolito involucrado en la síntesis y destrucción de la membrana celular. En los gliomas cerebrales, se ha visto que los niveles de colina incrementan con el grado tumoral.

N-acetil-aspartato (NAA): Es un marcador neuronal y su concentración baja significativamente en los tumores infiltrantes.

Creatina (Cr): Presenta menor variabilidad en el tejido cerebral, por lo que se utiliza a modo de referencia interna normalizando los valores de Cho y NAA.

Lactato (LA) y lípidos: Un aumento en la señal de estos metabolitos indica presencia de necrosis y mayor agresividad tumoral. Característico en los glioblastomas (Figura 1.3) [11].

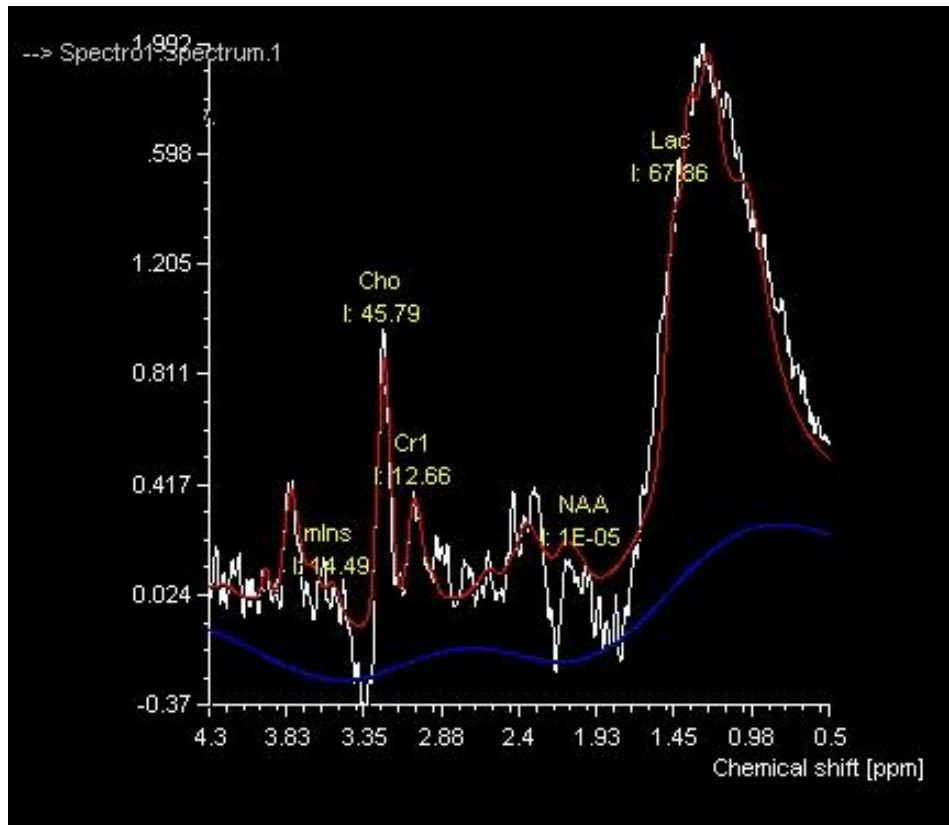


Figura I.3. Glioblastoma multiforme, estudio de espectroscopia que muestra un aumento del pico de Cho, disminución de niveles de NAA y un elevado pico de Lactato.

- **PERFUSIÓN:**

El objetivo de las técnicas de perfusión por RM magnética es determinar el grado de angiogénesis y la permeabilidad capilar principalmente en los tumores gliales (Figura I.4).

La perfusión mide el volumen sanguíneo cerebral relativo (VSCr) que muestra una correlación directa con el grado tumoral en los astrocitomas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los oligodendrogliomas de bajo grado también muestran un alto valor de VSCr.

Desde un punto de vista terapéutico, la perfusión por RM se emplea para evaluar la respuesta tumoral a los tratamientos con radioterapia, quimioterapia y antiangiogénicos [10].

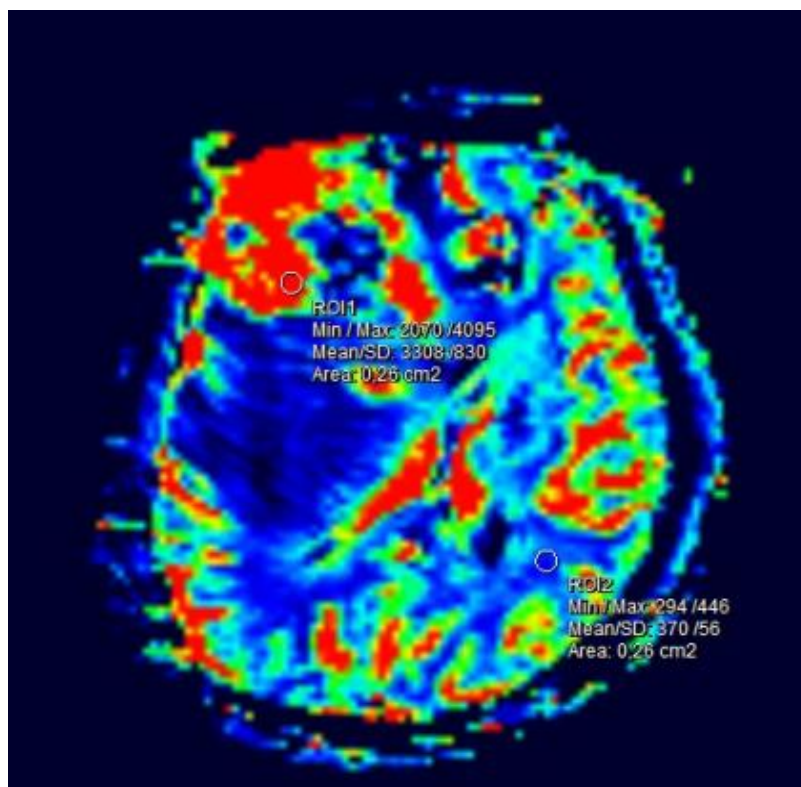


Figura I.4. Glioblastoma multiforme, estudio de perfusión que muestra un aumento del volumen sanguíneo del tumor.

1.4.4. TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES (PET).

La técnica de PET proporciona información sobre el estado metabólico del tumor. Se basa en la detección y análisis de la distribución de un radiofármaco de vida media corta administrado por vía intravenosa. En neuro-oncología los radiofármacos más utilizados son la 18fluorodesoxiglucosa (18FDG) y trazadores aminoácidos (11C-metionina, F-fluoroetiltirosina y F-fluorodihidroxifenilalanina). Estos últimos han demostrado ser más específicos para la detección y delimitación del tumor debido a su baja captación por el parénquima cerebral normal [12].

Actualmente en el estudio de los gliomas, la tomografía por emisión de positrones complementa la RM para valorar el grado de agresividad tumoral, es una herramienta útil para planificar el tratamiento con radio-quimioterapia y para diferenciar recidiva tumoral de radionecrosis [12].

1.4.5. TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE FOTÓN ÚNICO (SPECT).

A diferencia de la tomografía por emisión de positrones, la tomografía por emisión de fotón único emplea agentes con una vida media más larga entre los cuales el más usado en el estudio de los tumores gliales es el Talio 201. Muestra algunas limitaciones importantes como la baja resolución espacial y un prolongado tiempo de adquisición.

Sin embargo, sigue siendo una opción viable para los servicios que no tienen acceso al estudio por PET [13].

1.5. TRATAMIENTO.

1.5.1. CIRUGÍA.

El tratamiento quirúrgico es el tratamiento de elección en la mayoría de los tumores cerebrales. En los gliomas, la indicación del tratamiento quirúrgico ha sido motivo de controversia debido a que se ha visto que aumenta en escasa medida la supervivencia a medio plazo además del riesgo de ocasionar morbilidad quirúrgica [14].

A lo largo de los años, se han incorporado nuevos avances técnicos a la cirugía que han permitido precisar al máximo la localización y la extensión tumoral con el fin de extirpar el máximo tejido tumoral posible preservando la mayor funcionalidad neurológica del paciente. Entre estas técnicas se incluyen los sistemas de neuronavegación y ultrasonidos, resonancia magnética intraoperatoria y técnicas de mapeo cerebral [15]. Por lo que a día de hoy la morbilidad quirúrgica es menor y la mortalidad prácticamente nula.

Los objetivos principales de la cirugía son obtener muestras de tejido tumoral con el fin de establecer un diagnóstico de certeza, realizar la máxima resección posible causando el menor déficit neurológico y descomprimir el tejido sano para mejorar la sintomatología producida por el efecto masa [14].

La finalidad citorreductora de la cirugía proporciona claros beneficios sintomatológicos y terapéuticos. Conduce a un alivio sustancial de los síntomas generales como la cefalea, náuseas, vómitos y malestar general, y ocasiona una mejora de la acción de los tratamientos posteriores [14]. En cuanto a la extensión de la exéresis, numerosos estudios han mostrado la importancia de una resección total y su asociación con una mejora en la supervivencia global [15, 16], siendo uno de los factores pronósticos más importantes junto con la edad y el grado tumoral [17].

Cuando no se plantea la resección quirúrgica, la única opción de obtener tejido para establecer un diagnóstico es mediante biopsia estereotáxica, cuyas indicaciones son: tumores de localización profunda, lesiones en áreas elocuentes, lesiones múltiples o muy extensas no tributarias a tratamiento quirúrgico [17].

En los casos de recidiva, el manejo de los pacientes no está bien definido, las decisiones clínicas se basan fundamentalmente en el tratamiento previo, edad del paciente, índice de Karnofsky y el patrón de recaída. En el caso de glioblastomas recurrentes, solo un 20-30% de los pacientes son candidatos a cirugía, indicada especialmente en los tumores de gran tamaño y bien delimitados que causan déficits neurológicos y cuando el tiempo transcurrido entre las cirugías es de más de 6 meses. Sin embargo, se puede considerar la cirugía antes de este intervalo de tiempo en los pacientes sintomáticos con citorreducción primaria subóptima [18].

1.5.2. RADIOTERAPIA.

La radioterapia juega un papel importante en el tratamiento de los gliomas malignos desde la década de 1970. Se ha demostrado que la radioterapia adyuvante a la cirugía mejora de manera significativa el control local de la enfermedad así como la supervivencia de los pacientes.

En los ensayos iniciales se evidenció un incremento de la mediana de supervivencia de 14 a 36 semanas en pacientes tratados con radioterapia holocraneal después de la cirugía [19, 20]. Sin embargo, se han descrito numerosas complicaciones secundarias a la radioterapia holocraneal como radionecrosis progresiva e irreversible, lesiones en los vasos de pequeño calibre, oclusión vascular y desmielinización. Como secuelas tardías se incluyen leucoencefalopatía, neoplasias secundarias y adelgazamiento de las estructuras vasculares.

Actualmente, los avances tecnológicos y la incorporación de técnicas de imagen han permitido realizar el tratamiento radioterápico con gran precisión, preservando y minimizando los efectos secundarios en los tejidos sanos.

La radioterapia es fundamental como parte del tratamiento en los gliomas de bajo grado, sin embargo, existe cierta controversia sobre el momento de iniciar el tratamiento. El estudio de la EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) ha demostrado que la radioterapia inmediata incrementa la supervivencia libre de progresión pero no la supervivencia global [21]. Por ello, y por diferir los efectos secundarios de la radiación, en los gliomas de bajo grado se recomienda posponer el tratamiento radioterápico a la recidiva tumoral y limitar su uso inmediato a los casos de peor pronóstico.

La dosis de administración también ha sido objeto de estudio, en numerosos ensayos clínicos se ha examinado la utilidad de usar dosis bajas frente a dosis altas en el tratamiento de los gliomas de bajo grado [22], no se ha podido demostrar una diferencia significativa y además se ha visto una mayor incidencia de neurotoxicidad en los pacientes tratados con dosis altas. Actualmente la dosis indicada es de 50.4-54 Gy en fracciones de 1.8 Gy [23].

Con el fin de conseguir mayor precisión en la dirección de la radiación y minimizar la radiotoxicidad, se han empleado técnicas novedosas para el tratamiento de los gliomas de bajo grado, como la radioterapia de intensidad modulada y la radiocirugía estereotáctica. Sin embargo, no se ha evidenciado ninguna ventaja en comparación con la radioterapia convencional [22].

Para los gliomas de alto grado, el tratamiento estándar es con radioterapia focal a dosis de 60 Gy en 30-33 fracciones de 1.8-2 Gy después de la cirugía o la biopsia. Aumentar la dosis más de los 60 Gy no ha demostrado tener mucha utilidad. En pacientes ancianos o muy afectados neurológicamente, se proponen pautas de tratamiento más cortas con hipofraccionamiento de dosis, por ejemplo 40 Gy en 15 fracciones [24].

En el caso de los pacientes mayores de 70 años, el tratamiento con radioterapia, en comparación con tratamiento paliativo, ha demostrado un modesto incremento en la supervivencia sin afectar la calidad de vida de estos pacientes [25].

1.5.3. QUIMIOTERAPIA.

El papel de la quimioterapia como parte del tratamiento inicial de los gliomas del adulto ha sido objeto de múltiples estudios multicéntricos. Su inclusión en los esquemas de tratamiento ha demostrado su efectividad.

Entre los agentes más usados las nitrosoureas (Carmustina, Lomustina y Fotemustina) en monoterapia o en combinación con Procarbazona y Vincristina (esquema PCV). La Temozolamida es el agente alquilante más empleado en los tumores cerebrales por su buena penetración de la barrera hematoencefálica y buen perfil de toxicidad.

Actualmente, el esquema de Stupp es el tratamiento estándar en el glioblastoma, en un estudio fase III que incluía 573 pacientes con glioblastoma tratados con radioterapia exclusiva o con radioterapia asociada a Temozolamida [26], el tratamiento con Temozolamida mostró un aumento en la mediana de supervivencia de 12.1 meses a 14.6 meses, la supervivencia a los 2 años fue de 26.5% en los pacientes tratados Temozolamida frente a 10.4% en los tratados con radioterapia exclusiva.

Este esquema de tratamiento consiste en la asociación de radioterapia y quimioterapia concurrente con Temozolamida diario, y al mes de finalizada la radioterapia, se continúa con Temozolamida adyuvante en ciclos de 5/28 días durante 6 meses [27].

En los astrocitomas anaplásicos, no se ha probado el beneficio de emplear el mismo esquema terapéutico que los glioblastomas. Actualmente, el tratamiento consiste en quimioterapia o radioterapia, basado en el estudio NOA-04, que ha demostrado que la quimioterapia adyuvante con agentes alquilantes es igual de eficaz que la radioterapia [28].

A pesar de su uso habitual en el tratamiento de los gliomas de alto grado, el papel de la quimioterapia en los gliomas de grado II no está del todo claro. Los resultados iniciales del estudio RTOG 9802 mostraron un incremento de la supervivencia libre de progresión en los pacientes con gliomas de bajo grado tratados con quimioterapia y radioterapia frente a los que recibieron solo radioterapia, sin embargo no se evidenció ninguna diferencia en cuanto a la supervivencia global [29]. Datos recientes de este estudio evidencian que la administración de la quimioterapia además de la radioterapia prolonga tanto la supervivencia libre de progresión como la supervivencia global en pacientes con glioma de bajo grado, mayores de 40 años o con resección quirúrgica incompleta [30].

La presencia de la codeleción 1p19q en los oligodendrogliomas determina un subgrupo predictivo de respuesta a la quimioterapia tanto con PCV como con Temozolamida [31]. Numerosos estudios [31, 32] han demostrado que el beneficio de emplear la quimioterapia además de la radioterapia en estos tumores, evidenciando un

incremento de la supervivencia libre de progresión y de la supervivencia global en comparación con los tumores tratados exclusivamente con radioterapia. En el caso de los oligodendrogliomas de bajo grado, se ha visto que el tratamiento con quimioterapia inicial es una alternativa que podría evitar o retrasar los posibles efectos secundarios cognitivos del tratamiento radioterápico [33].

1.5.4. QUIMIOTERAPIA LOCAL.

Los implantes de Gliadel son polímeros biodegradables cargados con Carmustina (BCNU) que se administran en el lecho tumoral después de la resección quirúrgica. La FDA aprobó su uso en base a un ensayo fase III que mostró un incremento en la supervivencia global de 11.6 meses en el grupo control a 13,9 meses en el grupo tratado con BCNU intraoperatoria [34]. Sin embargo, por sus potenciales efectos secundarios y su dudoso beneficio en la supervivencia, el uso de esta quimioterapia intratectal continúa siendo motivo de controversia y no se dispone de un subgrupo definido de pacientes que se beneficien de este tratamiento [27].

1.5.5. BEVACIZUMAB.

El Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une de manera selectiva al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) inhibiendo la formación de los vasos sanguíneos [27].

En el año 2009, La FDA aprobó su uso en el tratamiento de los gliomas de alto grado recurrentes gracias a un ensayo fase II que mostró en pacientes tratados con Bevacizumab en monoterapia, una supervivencia libre de progresión a los 6 meses del 43%. Sin embargo, la agencia europea del medicamento no lo aprobó debido a que no se ha demostrado hasta ahora un beneficio en la supervivencia global en estudios fase III [18].

Sin embargo, su uso como tratamiento de segunda línea en los gliomas malignos recurrentes es muy frecuente porque además de mejorar los síntomas, permite disminuir la dosis de corticoides. Aunque hay que tener presente sus posibles efectos secundarios como hipertensión arterial y hemorragias, así como complicaciones menos frecuentes como eventos tromboembólicos, problemas en la cicatrización, proteinuria, perforación intestinal y encefalopatía posterior reversible [27].

Con el fin de evaluar el beneficio del Bevacizumab como tratamiento de primera línea en los glioblastomas, se diseñaron primero en los años 2008 y 2009 dos ensayos fase III (RTOG 0825 y AVAglio) cuyos resultados no apoyaron el uso de este fármaco en diagnóstico reciente. En ambos ensayos la supervivencia libre de progresión fue superior en el grupo tratado con Bevacizumab combinado con radioterapia y Temozolamida en comparación con el grupo control (10.7 meses frente a 7.3 en el estudio RTOG y 10.6 meses frente a 6.2 meses en el estudio AVAglio), sin embargo no logró prolongar la supervivencia global. En cuanto a la mejora de la calidad de vida de

los pacientes, los hallazgos fueron discrepantes entre ambos estudios [35, 36]. Por otro lado, los resultados del estudio GLARIUS demostraron que la combinación de Bevacizumab/Irinotecan es una buena alternativa a la Temozolamida para el tratamiento de los glioblastomas de diagnóstico reciente sin metilación de MGMT [37].

1.5.6. OTROS TRATAMIENTOS.

Además del Bevacizumab existen otros antiangiogénicos de nueva generación actualmente en fases avanzadas de evaluación clínica como Cilengitide (un inhibidor de las integrinas), Temozolamida (inhibidor de mTOR), Enzastaurina (inhibidor de fosfolipasa C), y otros.

Otra opción terapéutica en el glioblastoma es la inmunoterapia contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico variante III (EGFRvIII) que se expresa en la tercera parte de los glioblastomas. La vacuna para este marcador tumoral denominada Rindopepimut (PEPvIII), se evaluó en un estudio fase II multicéntrico en 18 pacientes con GBM primario que expresaron este marcador. La media de supervivencia global fue de 26 meses contra 15 meses en el grupo que recibió solo Temozolamida y la supervivencia libre de progresión de 14.4 meses contra 6.3 meses. Se destacó que los mejores resultados se presentaron en los pacientes sin metilación de MGMT. Además, los pacientes que desarrollaron respuesta por anticuerpos específicos contra EGFRvIII tuvieron una media de supervivencia global de 47.7 meses contra 22.8 meses en los que no desarrollaron una respuesta inmune. Estudios adicionales con vacunas están en desarrollo para verificar la utilidad clínica [27].

2. GLIOMAS DIFUSOS. CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA.

2.1. CLASIFICACIONES HISTOLÓGICAS.

El principio que Virchow estableció de comparar células neoplásicas con las células del tejido cerebral normal, constituyó la base científica de todas las clasificaciones que se han realizado sobre los tumores del sistema nervioso central [38].

En 1926, Bailey y Cushing proponen la primera clasificación de los tumores intracraneales siendo la referencia para clasificaciones posteriores [3]. Consideran que las células del sistema nervioso derivan de una célula madre del epitelio medular y pasan por varias fases de diferenciación hasta alcanzar las formas más maduras [3]. Teóricamente en cada una de estas fases de diferenciación, cada una de estas células podría originar una neoplasia, así tumores derivados de astrocitos se denominan astrocitomas, y oligodendrogliomas aquellos que se originan de la oligodendroglía, etc. Sin embargo, esta clasificación fue motivo de crítica por la descripción de una célula inexistente como el meduloblasto, y también por la complejidad de la serie espongoblástica.

A partir de esta clasificación, se propusieron otros sistemas de clasificación hasta que en 1949 Kernohan [39] y Ringertz [40] en 1950 introducen el concepto de gradación de los tumores estableciendo así una correlación entre los hallazgos microscópicos y el pronóstico de los mismos. En estas clasificaciones admiten un número reducido de tumores por cada tipo celular, subdivididos a su vez en grados progresivos de malignidad que se expresan de forma numérica. Este esquema dio un giro a la consideración de los astrocitomas, estableciendo definitivamente su potencial de desdiferenciación. Entre los inconvenientes de este sistema de clasificación, la dificultad para distinguir entre los grados tumorales y el desequilibrio en la subdivisión de algunos tumores como los oligodendrogliomas o los ependimomas.

En la misma línea pronóstica, se sugirieron varias clasificaciones con el fin de establecer una relación entre estos tumores y su evolución hasta que en 1979 nació la primera clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [41].

2.2. CLASIFICACIÓN DE LA OMS.

2.2.1. CLASIFICACIÓN OMS 1979.

La primera clasificación histológica de los tumores del sistema nervioso central (SNC) fue editada y publicada por Zülch en 1979 [41]. En esta clasificación los tumores astrocitarios incluyen:

- Astrocitoma (fibrilar, protoplásmico y gemistocítico)
- Astrocitoma pilocítico
- Astrocitoma subependimario de células gigantes
- Astroblastoma
- Astrocitoma anaplásico

Los tumores oligodendrogiales incluyen los oligodendrogliomas, los oligoastrocitomas y los oligodendrogliomas anaplásicos. No se reconoce la variante anaplásica del oligoastrocitoma.

Los glioblastomas en esta primera clasificación pertenecen al grupo de los tumores embrionarios y poco diferenciados. El glioblastoma de células gigantes se describe como una variante del glioblastoma y también dentro del grupo de los tumores vasculares denominado sarcoma monstrocelular.

2.2.2. CLASIFICACIÓN OMS 1993.

La segunda edición editada por Kleihues, Burger y Scheithauer [42], refleja los avances que aporta la incorporación de las técnicas inmunohistoquímicas al estudio histológico. El glioblastoma se clasifica como un tumor astrocitario dejando de pertenecer al grupo de los tumores embrionarios y de origen desconocido. Dentro de los tumores oligodendrogiales se incluyen los oligodendrogliomas y los oligodendrogliomas anaplásicos. El oligoastrocitoma y su variante anaplásica pertenecen al grupo de los tumores mixtos.

2.2.3. CLASIFICACIÓN OMS 2000.

La tercera edición la publican Kleihues y Cavenee en el año 2000 [43], incorpora los perfiles genéticos a las definiciones de los tumores cerebrales. Se mantiene la misma clasificación de los gliomas difusos que en la edición anterior.

2.2.4. CLASIFICACIÓN OMS 2007.

En 2007, la OMS realiza una nueva revisión de la clasificación de los tumores del SNC [44], hasta hace muy poco meses era la clasificación en la que nos basamos para establecer el diagnóstico y el grado tumoral. En esta edición se incluyó una nueva entidad, el glioblastoma con componente oligodendroglial para definir los gliomas mixtos de alto grado con necrosis.

2.2.5. CLASIFICACIÓN OMS 2016.

En este año se publicó la última clasificación de la OMS que, por primera vez, emplea parámetros moleculares además de la histología para definir numerosas entidades, proponiendo así un nuevo concepto en el diagnóstico de los tumores del sistema nervioso central, estructurado en la era molecular [1].

En esta clasificación, los gliomas difusos se engloban dentro de un mismo grupo formado por astrocitomas, oligodendrogliomas, glioblastomas, oligoastrocitomas y gliomas de la línea media.

Los astrocitomas difusos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas se dividen a su vez en 3 grupos en función del estado de gen de IDH: IDH mutado, IDH nativo y NOS cuando no se puede determinar la mutación. Sin embargo, el diagnóstico de oligodendroglioma implica tanto la mutación del gen de IDH como la presencia de la codeleción 1p19q. Y por último, el diagnóstico de oligoastrocitoma se limita a los casos en los que no se pueden realizar los estudios moleculares.

2.3. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LOS GLIOMAS DIFUSOS.

Histológicamente, el astrocitoma difuso se caracteriza por ser una lesión infiltrante de baja densidad celular. Las células asientan en un fondo fibrilar, muestran núcleos alargados con leve atipia y una actividad mitótica inapreciable (Figura 1.5). La confirmación de la infiltración en los astrocitomas difusos es fundamental para diferenciar estos tumores de otras entidades circunscritas como la gliosis reactiva, el astrocitoma pilocítico o el xantoastrocitoma pleomórfico.

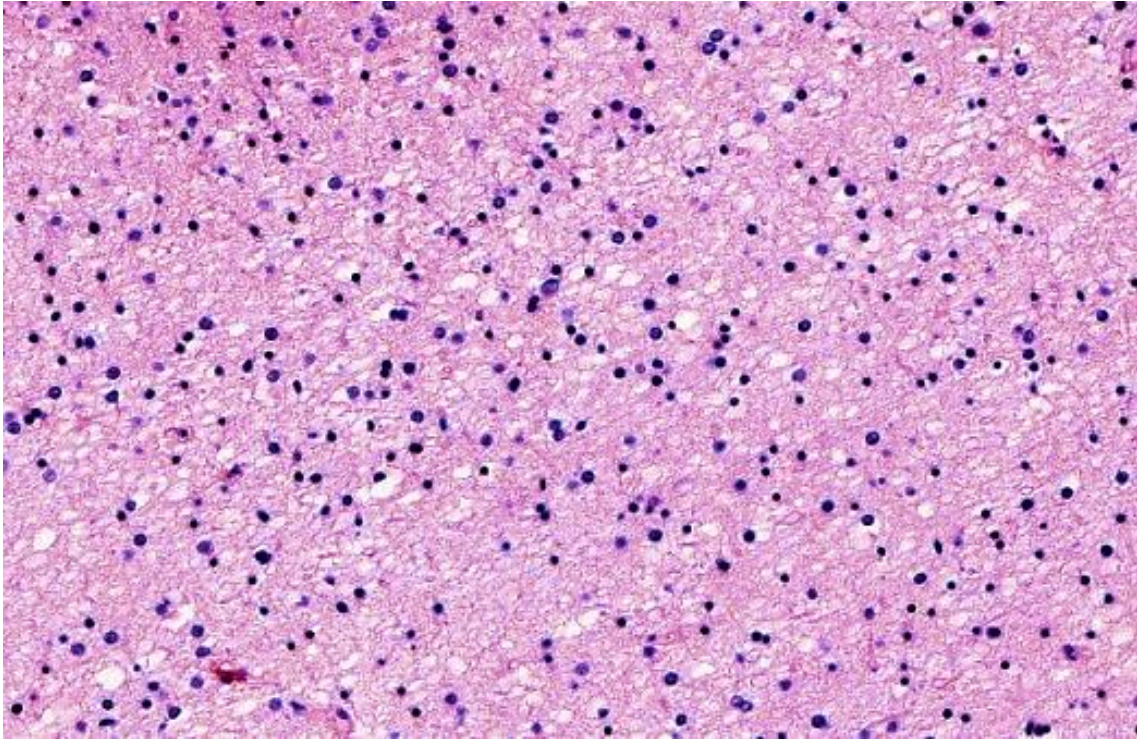


Figura I.5. Astrocitoma difuso.

El astrocitoma gemistocítico es una variante del astrocitoma difuso que se caracteriza por la presencia de gemistocitos, estas células tumorales muestran abundante citoplasma eosinófilo y un núcleo periférico (Figura I.5). Para el diagnóstico de esta variante, el componente gemistocítico debe suponer el 20% del tumor [1]. (Figura I.6)

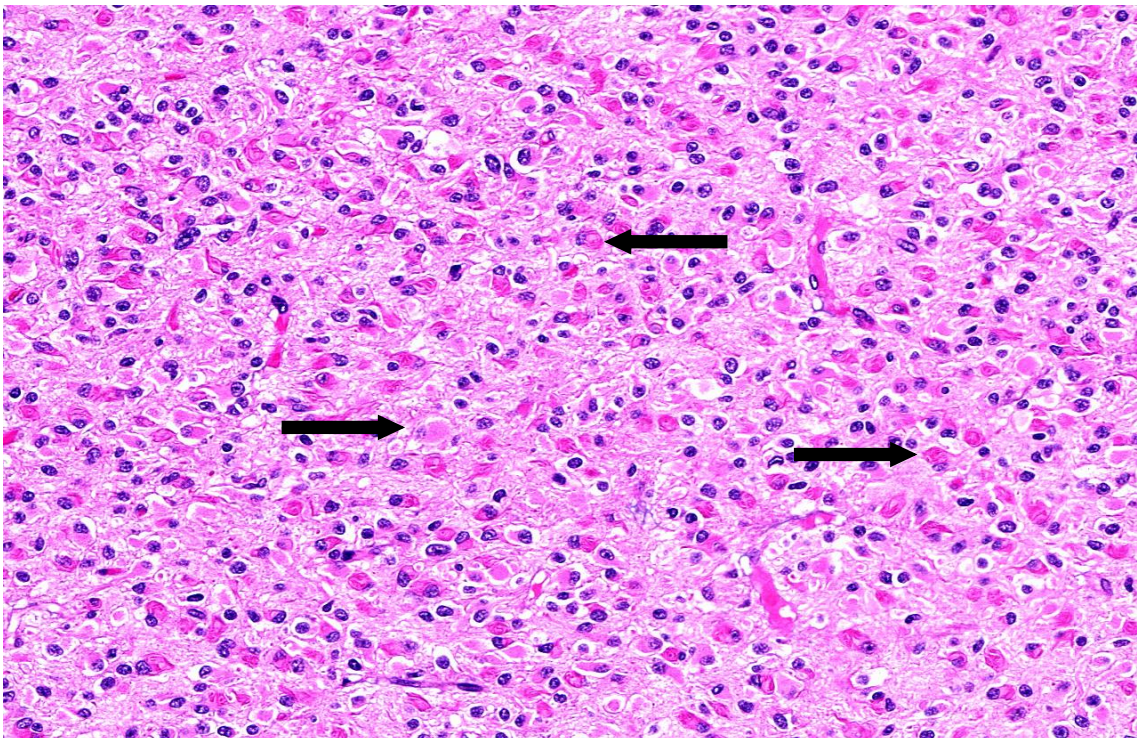


Figura I.6. Astrocitoma gemistocítico. El componente de gemistocitos (flechas) supone >20% del tumor.

Los astrocitomas anaplásicos se distinguen de los astrocitomas difusos por la presencia de actividad mitótica, generalmente muestran mayor densidad celular así como mayor grado de atipia nuclear. Sin embargo, a veces las diferencias entre ambas entidades pueden ser muy sutiles y depender únicamente del hallazgo de una figura de mitosis (Figura I.7).

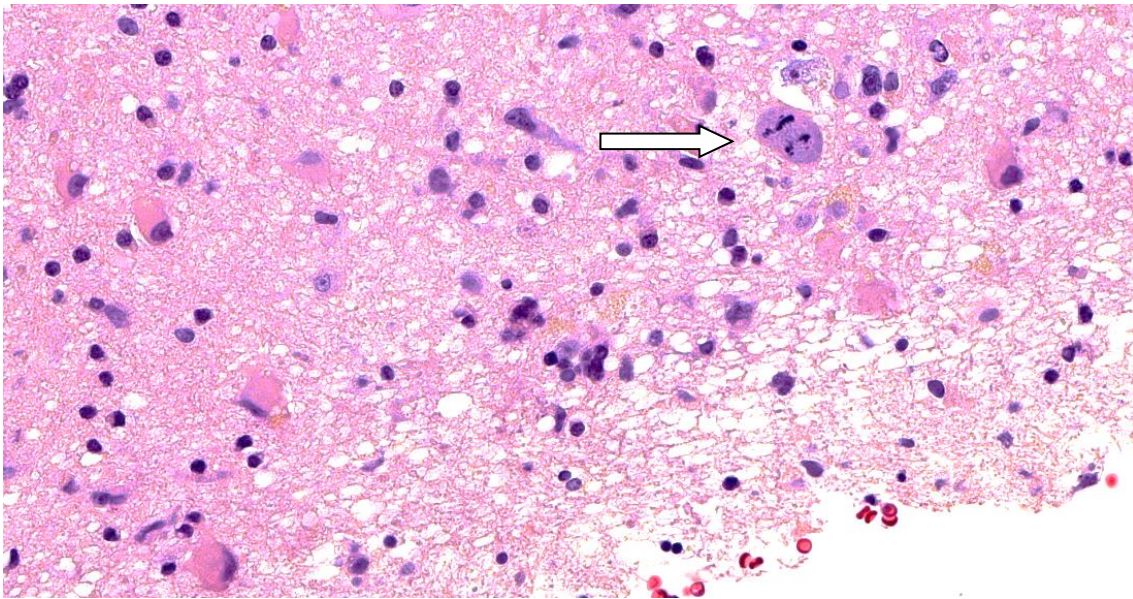


Figura I.7. Astrocitoma anaplásico, mitosis (flecha).

Los glioblastomas grado IV suponen el mayor grado de malignidad dentro de los astrocitomas infiltrantes, se caracterizan por presentar todos los criterios histológicos de malignidad: atipia nuclear, figuras de mitosis, signos de proliferación endotelial y/o necrosis tumoral. La hiperplasia vascular endotelial, proliferación endotelial o proliferación microvascular consiste en el engrosamiento de las paredes vasculares secundario a la hiperplasia de las células endoteliales y formación de estructuras vasculares anómalas con múltiples luces simulando los glomérulos renales (Figura I.8.a). La necrosis en el glioblastoma se caracteriza por una disposición de las células tumorales en pseudoempalizada alrededor de focos irregulares de necrosis (Figura I.8.b).

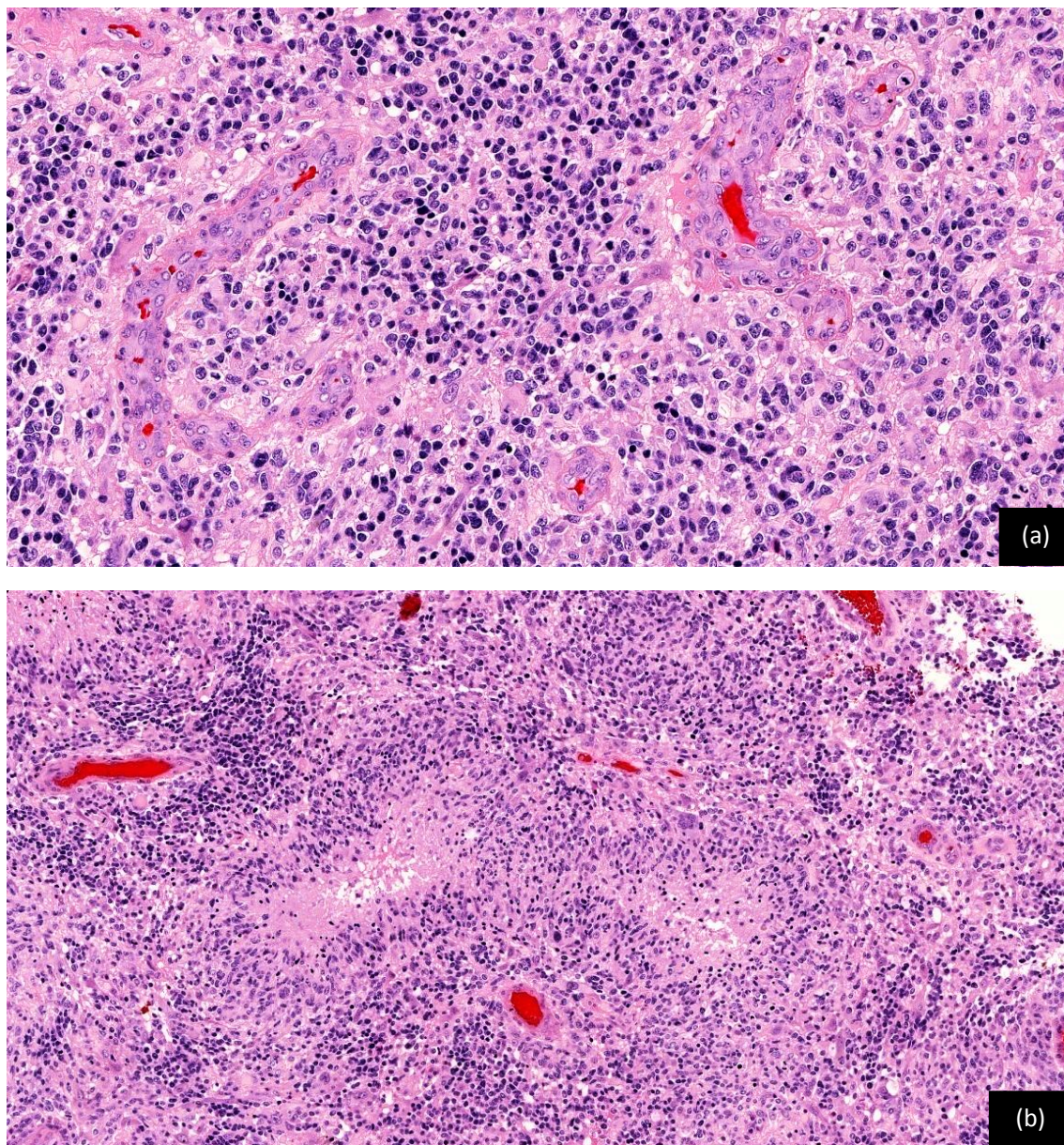


Figura I.8. Glioblastoma multiforme (GBM), a) proliferación endotelial, b) necrosis con pseudoempalizada.

Microscópicamente, los oligodendrogliomas están formados por células monomorfas, con núcleos centrales redondos y rodeados por un halo claro adoptando la clásica imagen en “huevo frito”. Entre las células tumorales hay una red vascular abundante formada por finos capilares. Generalmente los oligodendrogliomas infiltran difusamente la corteza cerebral mostrando áreas de disposición subpial y de satelitosis perineuronal. Sobre esta arquitectura básica, el oligodendroglioma presenta fenómenos regresivos como la quistificación, calcificación y signos de hemorragia. Se pueden evidenciar ocasionales figuras de mitosis, sin embargo una alta actividad mitótica y la presencia de hiperplasia endotelial o necrosis son características de los oligodendrogliomas anaplásicos (Figura I.9).

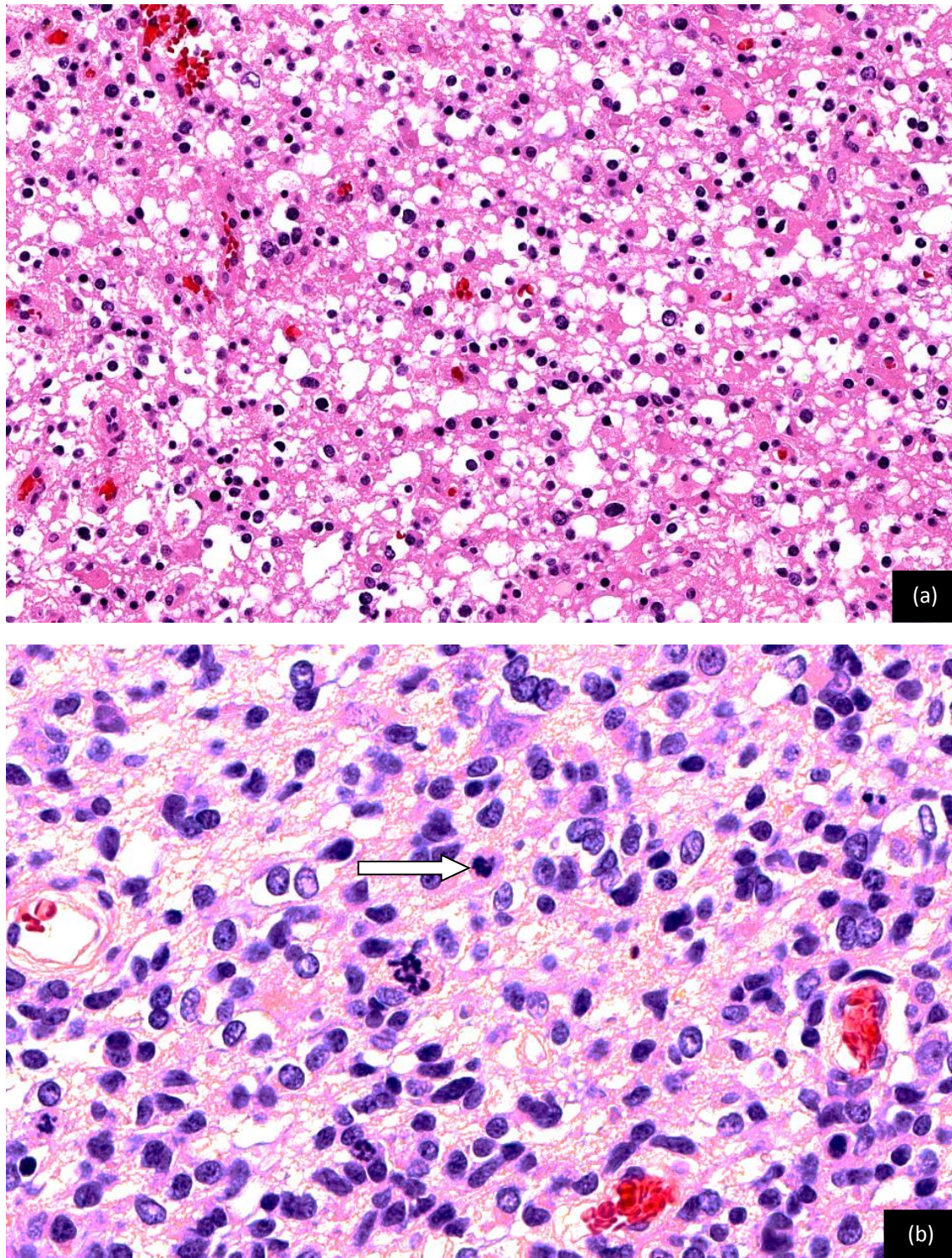


Figura I.9.a) Oligodendroglioma, b) Oligodendroglioma anaplásico, mitosis (flecha).

Los oligoastrocitomas muestran características morfológicas similares a los astrocitomas y oligodendrogliomas con la presencia de ambos componentes en el mismo tumor. Histológicamente, se han descrito 2 tipos de oligoastrocitomas, el

bifásico en el cual se distinguen áreas claramente separadas de astrocitoma y de oligodendroglioma, y el tipo difuso en el que ambos componentes están entremezclados, siendo este último el más frecuente en la literatura.

3. GLIOMAS DIFUSOS. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS CLÁSICOS.

3.1. TIPO HISTOLÓGICO.

La clasificación histológica continua siendo en la actualidad esencial para establecer la estrategia terapéutica y determinar el pronóstico de los pacientes con glioma. Numerosos estudios han demostrado la importancia del subtipo histológico desde un punto de vista pronóstico y predictivo.

Entre los gliomas de bajo grado, Shaw et al. evidenciaron que el pronóstico de los oligodendrogliomas y los oligoastrocitomas es claramente mejor que los astrocitomas fibrilares [45], con unas medias de supervivencia de 9.8; 7.1 y 4.7 años respectivamente. Para los gliomas de alto grado, los oligodendrogliomas y gliomas mixtos mostraron una supervivencia similar (4.5 años) y más favorable que los astrocitomas (0.8 años). Resultados similares obtuvieron los grupos de Winger, Miller y Tortosa [46-48] demostrando que la presencia de un componente oligodendroglioma se relacionaba con mejor pronóstico.

Además de suponer un factor de buen pronóstico para los gliomas difusos, se ha visto que los pacientes con oligodendroglioma presentan una mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia empleando el esquema PCV o la Temozolamida [49, 50].

Sin embargo, los trabajos realizados en los gliomas mixtos muestran resultados contradictorios, algunos estudios indican que los pacientes con oligoastrocitomas y oligodendrogliomas tienen un pronóstico similar [45, 48]. Otras series, como las de Jeremic, Kim y Park [51-53], señalaban diferencias estadísticamente significativas entre los oligodendrogliomas y los gliomas mixtos, tanto en el pronóstico como en la respuesta al tratamiento adyuvante. Estas discrepancias se deben fundamentalmente a que la definición de los oligoastrocitomas se basa exclusivamente en criterios morfológicos muy subjetivos dando lugar a una gran variabilidad interobservador. Un estudio de la EORTC en el que se revisaron 114 gliomas grado III por 9 patólogos independientes, únicamente coincidieron en un 8% de los oligoastrocitomas anaplásicos [54]. Smith et al. revisaron 162 casos y el resultado de 3 patólogos fue unánime en el 13% de los gliomas mixtos, el 69% de los oligodendrogliomas y el 76% de los astrocitomas [55].

3.2. GRADO HISTOLÓGICO.

Se han empleado numerosos sistemas de gradación como herramienta pronóstica y para fines terapéuticos. En 1988, Daumas Dupport et al., con el fin de mejorar la reproducibilidad del sistema propuesto por Kernohan, introdujeron un método (St. Anne Mayo) basado en la valoración de cuatro criterios histológicos para gradar los tumores astrocitarios: atipia nuclear, figuras de mitosis, proliferación endotelial y necrosis. Con este sistema evidenciaron una clara asociación entre el grado histológico y la supervivencia [56].

La clasificación de la OMS del año 2007 definía 4 grados de creciente malignidad que predicen el comportamiento biológico de los tumores del sistema nervioso central:

- Grado I: Bien circunscritos, crecimiento lento, baja proliferación, curación con cirugía.
- Grado II: Generalmente infiltrantes y suelen recurrir a pesar de la baja proliferación.
- Grado III: Signos histológicos de malignidad como atipia nuclear y frecuentes mitosis. Requieren tratamiento adyuvante.
- Grado IV: Histológicamente muy malignos. Rápida evolución y mal pronóstico.

Para determinar el grado histológico de malignidad de los gliomas difusos, se emplean los mismos criterios histológicos de Daumas Dupport. La supervivencia media descrita para los pacientes con glioblastoma multiforme (grado IV) es de 1-2 años, en el caso del astrocitoma anaplásico (grado III) es de 3 años, y en los astrocitomas de bajo grado (grado II) es de 6-8 años. La supervivencia media descrita en los pacientes con oligodendrogliomas de bajo grado (grado II) es de 12 años y para los oligodendrogliomas anaplásicos (grado III) es de 3 a más de 10 años. En cuanto a los pacientes con gliomas mixtos, las medias de supervivencia son de 6 y 3 años para años para los tumores grado II y grado III respectivamente [57].

Este sistema se consideró durante muchos años una herramienta práctica y eficaz para la clasificación de los gliomas, sin embargo se ha visto que presenta algunas limitaciones. La valoración de algunos de estos parámetros histológicos se presta a la subjetividad y esto conlleva a cierta variabilidad interobservador. El mismo grupo de Daumas Dupport, cuando propuso este método de gradación, evidenció estas diferencias sobre todo en el diagnóstico de los astrocitomas grado II, debidas fundamentalmente al conteo mitótico [56]. En los trabajos de Brunner y Aldape [58, 59], se revisaron series largas de biopsias cerebrales y se constataron graves discrepancias que implicaban el manejo terapéutico de los pacientes en el 8.8 y el 16% de los casos respectivamente.

Además de la subjetividad de los criterios histológicos también hay que considerar los errores de gradación que se producen en función del muestreo, de la cantidad de tumor extirpado (resección quirúrgica frente a biopsia esterotáctica) y a la heterogeneidad intratumoral descrita en los gliomas difusos [60].

En la clasificación actual del año 2016, se siguen empleando los mismos criterios histológicos para clasificar los gliomas difusos, sin embargo la definición del grado

tumoral depende de los criterios histológicos y moleculares como se especifica en la siguiente tabla (Tabla I.2) [1].

<u>Astrocitomas y oligodendrogliomas difusos</u>	
Astrocitoma difuso IDH-mutado	II
Astrocitoma anaplásico IDH-mutado	III
Glioblastoma IDH-nativo	IV
Glioblastoma IDH-mutado	IV
Glioma difuso de la línea media, H3 K27M-mutado	IV
Oligodendroglioma, IDH-mutado y con codeleción 1p19q	II

Tabla I. 2. Clasificación de la OMS 2016 de los gliomas difusos. Modificado de Louis DN et al. 2016 [1].

3.3. MARCADORES DE PROLIFERACIÓN.

La actividad proliferativa es un factor determinante para predecir el comportamiento y la agresividad de los gliomas difusos, por lo que su medición es fundamental para establecer el pronóstico y el tratamiento de los pacientes.

Histológicamente, el conteo mitótico es un buen indicador de la actividad proliferativa. Inicialmente, con el sistema de gradación de St. Anne-Mayo, únicamente se valoraba la presencia o ausencia de figuras de mitosis para establecer el grado tumoral y se consideraban astrocitomas grado II aquellos que carecían de actividad mitótica. Posteriormente, Giannini et al. demostraron que la presencia de una única figura de mitosis no influía en el pronóstico de los pacientes con astrocitoma grado III mostrando supervivencias similares a aquellos con astrocitoma grado II [61]. Los criterios actuales sugieren la valoración de la actividad mitótica en función del tamaño de la muestra, la presencia de una mitosis en una biopsia estereotáctica se corresponde con un astrocitoma de alto grado, sin embargo este hallazgo en una pieza de mayor tamaño es indicador de un astrocitoma difuso. Además de la extensión del tejido evaluado hay que tener en cuenta los efectos de la heterogeneidad tumoral en los astrocitomas, ambos factores influyen negativamente en la reproducibilidad del conteo mitótico.

En el caso de los oligodendrogliomas, el valor pronóstico de la actividad mitótica es motivo de controversia. La clasificación de la OMS describe un incremento de la actividad mitótica en el oligodendroglioma anaplásico sin especificar un punto de corte. En este sentido, Giannini et al. sugieren que la presencia de al menos seis mitosis por cada diez campos de gran aumento incluso de forma focal, predice una reducción en la supervivencia[62].

Numerosos métodos cuantitativos se han empleado para medir la actividad proliferativa mostrando una buena correlación con la supervivencia de los pacientes con glioma, entre ellos están la citometría de flujo, las técnicas inmunohistoquímicas con Bromodeoxiuridina, antígeno nuclear celular proliferativo (PCNA) y Ki67/MIB-1.

Actualmente, el Ki67 es el marcador de proliferación más empleado en la rutina diaria. Ki67 es una proteína nuclear tipo no histona, que se expresa en las fases proliferativas del ciclo celular y está ausente en las células quiescentes. Los niveles de expresión de Ki67 reflejan la proliferación y la malignidad de las células tumorales. Un incremento en la expresión de este marcador se relaciona con mayor grado de malignidad y un peor pronóstico en los pacientes con glioma [63]. Dos meta-análisis que incluyen 19 y 51 estudios sobre la expresión de Ki67 en gliomas, confirman el valor pronóstico y predictivo de este marcador [63, 64]. Sin embargo, ambos estudios coinciden en algunos inconvenientes de esta técnica como el amplio espectro de los índices de expresión descritos para un mismo grado tumoral además de la falta de consenso sobre un determinado punto de corte. Por lo que la interpretación de esta técnica se debe realizar en combinación con otros factores pronósticos y no de manera aislada.

4. GLIOMAS DIFUSOS. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

4.1. ALTERACIONES DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR.

4.1.1. ALTERACIONES DE LA VÍA P53.

Las alteraciones de la vía TP53/MDM2/p14ARF juegan un papel importante en el desarrollo de los astrocitomas y glioblastomas.

El gen p53 (TP53) localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) codifica la proteína p53 cuya principal función es mantener la integridad y estabilidad del genoma. En condiciones normales, la proteína p53 se encuentra en niveles bajos en las células, debido a una rápida degradación mediada por MDM2, que a su vez está regulado por p14ARF [65, 66] (Figura I.10).

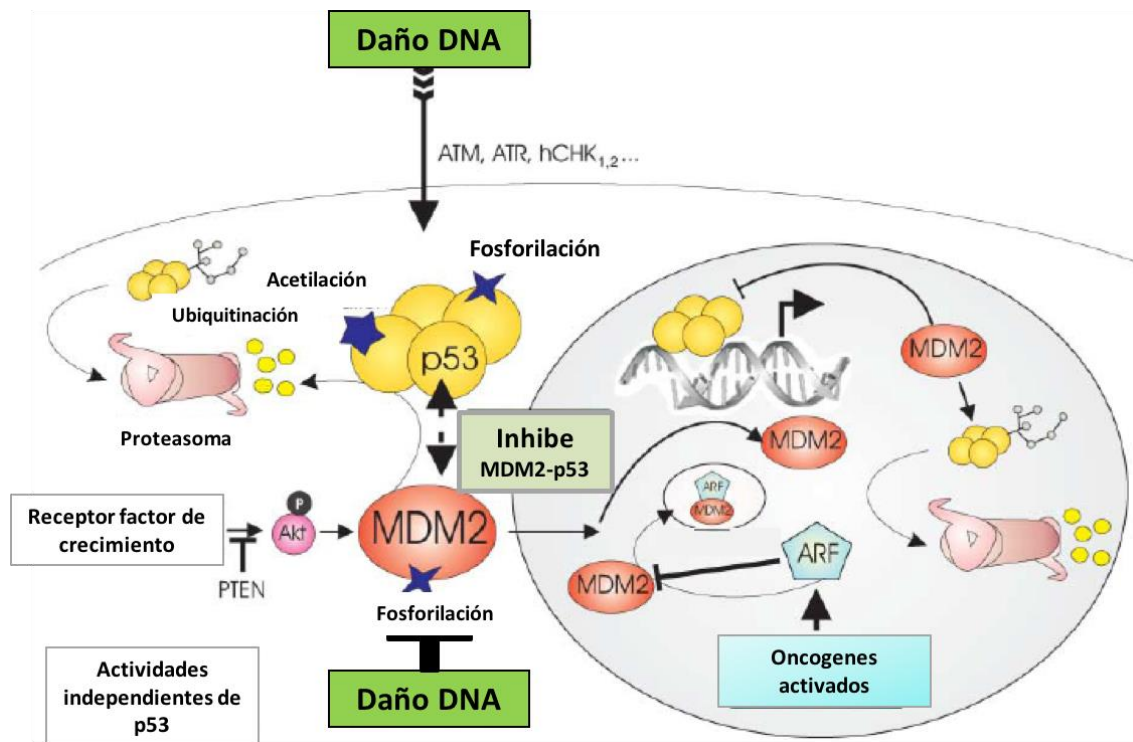


Figura I.10. Vía TP53/MDM2/p14ARF. Modificado de Ute M. Moll y Olenski Petrenko 2003 [65].

En respuesta a estrés celular, p53 es estabilizada a través de modificaciones postraduccionales, convirtiéndola en una proteína funcional para iniciar los programas celulares que llevan a la realización de sus funciones como supresor de tumores: detención del ciclo celular, reparación del daño al ADN o apoptosis[65, 66].

En condiciones normales p53 está unido y secuestrado por MDM2 impidiéndose la actividad transcripcional. Si aparece daño en el ADN y se libera p53 de MDM2, actuando como factor de transcripción, promueve la transcripción de otros genes implicados en reparación de ADN y/o apoptosis. Si P53 no está dañado se repara el ADN si es posible, en caso contrario la célula entra en apoptosis. Si existen mutaciones de p53, los daños del ADN no pueden ser reparados provocándose un aumento de división celular y una disminución de la apoptosis.

La mutación de TP53 es un evento precoz en el desarrollo de los astrocitomas, alrededor de dos tercios de los astrocitomas difusos presentan esta alteración genética, tanto los astrocitomas anaplásicos, que corresponden a una etapa intermedia en la evolución de los astrocitomas de bajo grado hacia glioblastomas, como los glioblastomas secundarios presentan esta mutación con tasas similares [67].

Las transiciones C:G→A:T son las mutaciones más frecuentes de TP53 descritas en los glioblastomas secundarios y alrededor del 57% de estas alteraciones han sido identificadas en los codones 248 y 273 del gen. Por el contrario, las mutaciones de TP53 en los glioblastomas primarios son menos comunes, no sobrepasando el 30% de los casos. Además, están distribuidas de manera homogénea por todos los exones y

en la mayoría de los casos constituyen eventos secundarios debido a la inestabilidad genómica durante la progresión del tumor [67].

Por otra parte, el 10% de los glioblastomas primarios muestran amplificación de MDM2, presente únicamente en aquellos casos sin alteración de TP53. Y el 76% de los glioblastomas presentan pérdida de expresión de p14ARF secundaria a delección en homocigosis o metilación del promotor del gen. La metilación del promotor de p14ARF se ha descrito con mayor frecuencia en los glioblastomas secundarios que en los glioblastomas primarios, sin embargo las diferencias entre los dos subtipos no fueron significativas [67].

Los oligodendrogliomas anaplásicos presentan alteraciones de la vía p53 en el 50% de los casos, siendo las más frecuentes a nivel de p14ARF (40%), seguidas de la mutación de TP53 (10%) y de la amplificación de MDM2 (5%). En cuanto a los oligodendrogliomas grado II, solo se evidenció alteración de p14ARF en el 21% de los casos [68].

4.1.2. ALTERACIONES DE LA VÍA RB.

Las alteraciones de la vía p16INK4a/RB1 son importantes en el desarrollo de glioblastomas primarios y secundarios.

La proteína codificada por el gen del retinoblastoma (RB1) controla la progresión de la fase G1 a la fase S en el ciclo celular. El complejo CDK4/Ciclina D1 fosforila la proteína RB1 liberando el factor de transcripción E2F que activa los genes implicados en esta transición de G1 a S. Las proteínas p16INK4a y p15INK4B codificadas por CDKN2A y CDKN2B respectivamente, inhiben al complejo CDK4/Ciclina D1 y por tanto la transición G1-S (Figura I.11) [66-68].

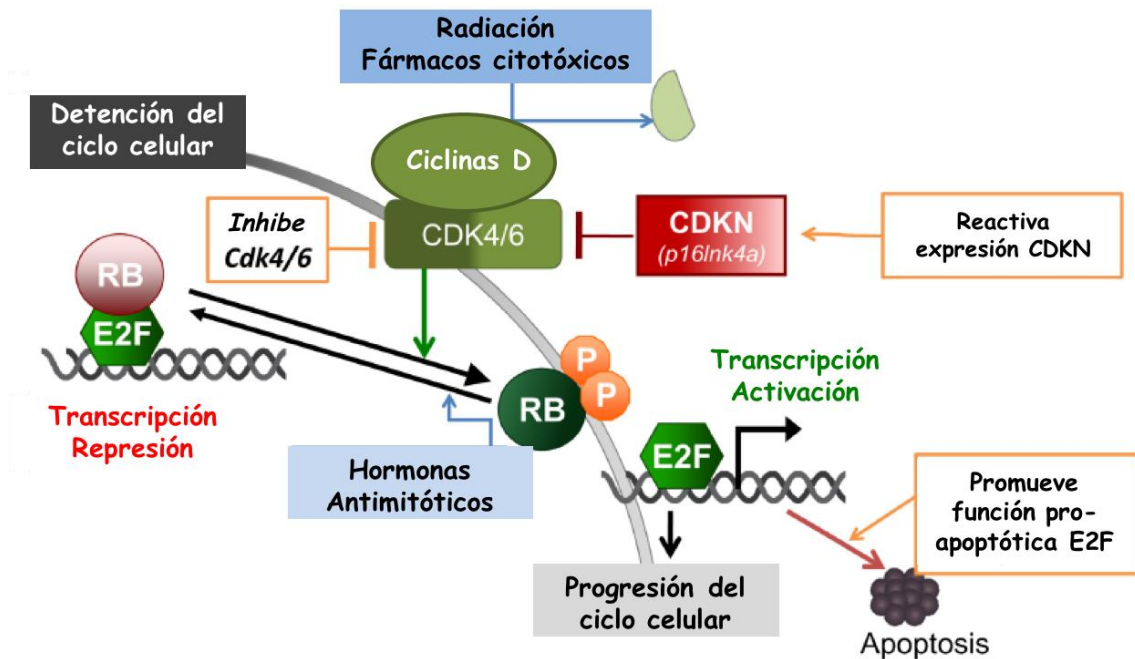


Figura I.11. Componentes de la vía RB. Modificado de Knudsen et al.2010[69].

La función anormal de *rb1* puede ser por tanto resultado de la expresión alterada de los genes de *RB1*, la *p16INK4a* o *CDK4*. Si se amplifica *CDK4* o se pierde expresión de *p16INK4a* por pérdida en homocigosis, se provocara una fosforilación continuada de *RB1* que no podrá secuestrar a *E2F*, por lo que la división celular estará continuamente activada.

Los datos del TCGA (The Atlas Genome Cancer) evidencian alteraciones de esta vía en el 77% de los glioblastomas, siendo las más frecuentes las deleciones de *CDKN2A* y *CDKN2B* en el cromosoma 9p21 (55% y 53%), seguidas de la amplificación de *CDK4* en el 14% de los casos y de la mutación o deleción homocigota de *RB1* (11%). La metilación del promotor de *RB1* es más común en los glioblastomas secundarios (43%), sin embargo no se ha detectado en los astrocitomas de bajo grado sugiriendo que es un evento tardío en la progresión hacia los glioblastomas secundarios [70].

En los tumores oligodendrogiales, se ha visto que estas alteraciones son mucho más frecuentes en los oligodendrogliomas anaplásicos (65%) que en los oligodendrogliomas grado II (4%). En el 70 % de los casos se han detectado alteraciones de *CDKN2B* (40%) y *CDKN2A* (30%), en el 20% amplificaciones de *CDK4* y alteraciones de *RB1* en el 15% [68].

4.1.3. ALTERACIONES DE LA VÍA RTK/Ras/PI3K.

La activación de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) puede ocurrir a través de Ras activado o directamente por los receptores tirosina quinasa (RTK), que responden a

varios factores de crecimiento y citoquinas. La PI3K activa, fosforila el fosfatidilinositol 3,4 difosfato (PIP2) convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), el cual a su vez, conduce a la activación de Akt y mTOR. Esto promueve la proliferación celular y un incremento en la supervivencia de las células por inhibición de la apoptosis [66].

PTEN es una proteína implicada en la regulación negativa de la vía PI3K/Akt mediante defosforilación de PIP3, inhibiendo así la activación de Akt y la proliferación celular [66] (Figura I.12).

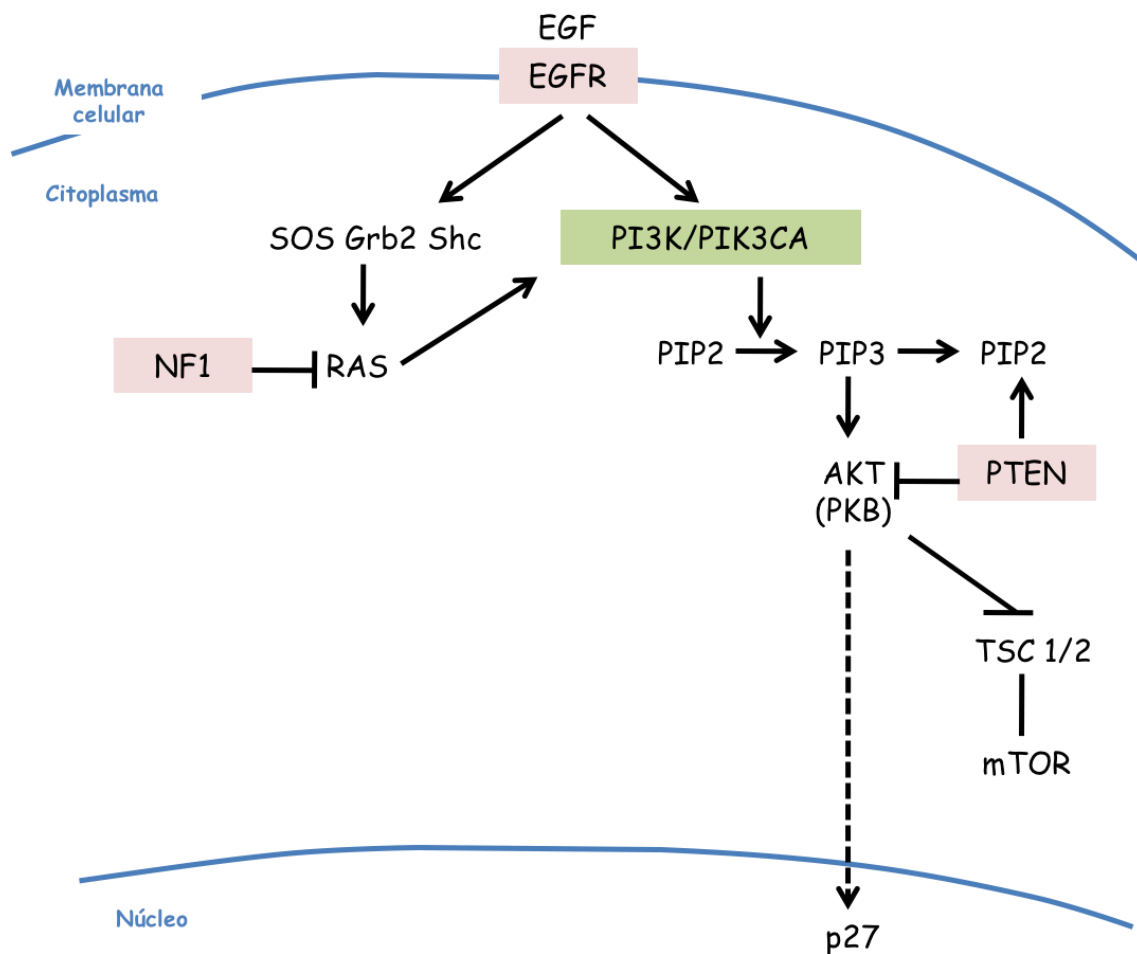


Figura I.12. Vía RTK/Ras/PI3K. Modificado de Ohgaki et al. 2009[66].

El gen NF1 localizado en el cromosoma 17q11.2 codifica la proteína supresora de tumores Neurofibromina cuya principal función es la inactivación de Ras [66].

El TCGA identifica alteraciones relacionadas con esta vía en el 88% de los glioblastomas entre las cuales están las amplificaciones de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y las mutaciones de PTEN, más frecuentes en los glioblastomas primarios que en los secundarios (40% y 15-40% respectivamente). Las mutaciones y amplificaciones de PI3K son raras en ambos subtipos de glioblastoma (5% en los

glioblastomas primarios y 13% en los secundarios) y las mutaciones y deleciones de NF1 se han descrito en el 18% de los glioblastomas [70].

En los gliomas difusos de bajo grado, se han detectado alteraciones del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y su receptor (PDGFR), implicados en la activación de Ras. Su expresión está aumentada tanto en los astrocitomas como en los oligodendrogliomas, sin embargo la amplificación del gen solo la presentan algunos glioblastomas [71].

Otra alteración identificada en los gliomas de bajo grado es la metilación del promotor del gen de PTEN, en más del 50% de los astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas grado II [72].

Como consecuencia de las alteraciones relacionadas con la esta vía de señalización, se inicia una cascada de transducción de señales (Ras/MAPK y PI3K/Akt) conllevando a una disminución de la apoptosis, un incremento de la transcripción del ADN, de la angiogénesis y de la proliferación celular.

4.2. BIOMARCADORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS DE USO CLÍNICO PARA EL MANEJO DE LOS PACIENTES.

4.2.1. MUTACIONES DE IDH1 E IDH2.

La isocitrato deshidrogenasa (IDH) es una enzima del ciclo de Krebs dependiente de $\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$ que cataliza la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -cetoglutarato con la consiguiente formación de NADPH/NADH [73](Figura I.13).

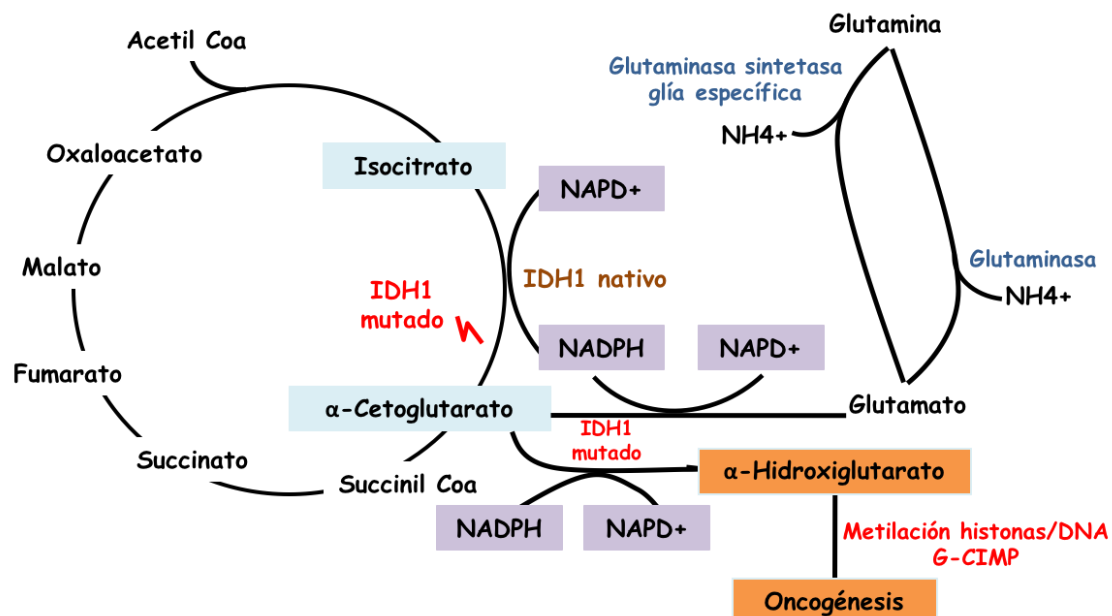


Figura I.13. Diagrama gliomagenesis relacionada a mutación de IDH1. Modificado de Olar et al. 2012[74].

El descubrimiento y la caracterización de las mutaciones de IDH1 e IDH2 en un subgrupo de gliomas difusos han llevado a un replanteamiento de la clasificación de los gliomas difusos. En los últimos seis años, el estatus mutacional de IDH se considera un factor pronóstico significativo y numerosos estudios han demostrado que los gliomas con mutación de IDH conforman un grupo de neoplasias genéticamente y clínicamente distintas en comparación con aquellos tumores con IDH nativo.

Las mutaciones de IDH1 se han descrito por primera vez en los glioblastomas en el año 2008 y posteriormente en el resto de gliomas difusos. Alrededor del 80% de los gliomas grado II-III y glioblastomas secundarios presentan mutación de IDH, sin embargo en los glioblastomas primarios la frecuencia es menor (5%)[75]. También se ha descrito esta alteración en otros tipos tumorales como la leucemia mieloide aguda, linfoma de células T angioinmunoblástico, condrosarcoma, colangiocarcinoma intrahepático y carcinoma de próstata [74].

Más del 90% de las mutaciones de IDH se localizan en el gen de IDH1 y entre estas la más frecuente es IDH1R132H, esta mutación puntual consiste en un cambio de una adenina por guanina en la posición 395 (395 A>G) que conlleva a la sustitución de una arginina por histidina en el residuo 132 de la proteína. Se han descrito otras mutaciones en el codón 132 de IDH1 y en el codón 172 de IDH2 como se muestra en la siguiente tabla (Tabla I.3).

Frecuencia de las mutaciones de IDH1/IDH2 en los gliomas difusos			
	Nucleótidos	Amino-ácidos	Rangos de frecuencia *
Gen IDH1	G395A	R132H	85-100%
	C394A	R132S	1,5-5%
	C394T	R132C	1,5-4%
	C394G	R132G	1-3%
	G395T	R132L	0,5-3%
	C394G G395T	R132V	0,5%
Gen IDH2	G515A	R172K	Hasta un 65%
	A514T	R172W	Hasta un 16,2%
	G515T	R172M	Hasta un 19,3%

Tabla I. 3. Frecuencia de mutaciones de IDH1/IDH2 en los gliomas difusos. Modificado de Olar et al. 2012[74]. *rangos de frecuencia según las series publicadas.

Las mutaciones de IDH1/2 suponen un evento precoz en el desarrollo de los gliomas, incluso anteriores a las alteraciones moleculares específicas de la diferenciación oligodendroglial o astrocitaria, sin embargo el papel de la mutación de IDH en la patogénesis de estos tumores sigue siendo incierto.

Se ha sugerido un posible mecanismo secundario a la formación de 2-hidroxiglutarato catalizado por IDH mutado a partir de α -cetoglutarato (Figura I.13), la acumulación de este metabolito interfiere en los mecanismos de regulación epigenética de las células e induce un patrón hipermetilador del ADN (fenotipo G-CIMP).

Por otro lado, la disminución de los niveles de α -cetoglutarato y NADPH se han relacionado con un incremento en los niveles del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) promoviendo así la angiogénesis y la proliferación celular [73].

El estado del gen de IDH se considera el mejor factor pronóstico, superando al grado histológico como se evidenció en el trabajo de Hartmann et al., en el que demostraron que los pacientes con astrocitomas grado III carentes de mutación de IDH tenían peor pronóstico que aquellos con glioblastomas IDH mutados [76].

En el estudio de Olar et al., señalan que el índice mitótico no se asocia con el pronóstico en aquellos tumores con mutación de IDH sugiriendo que el impacto de las mitosis en la evolución de los pacientes con glioma depende del estado del gen de IDH [77].

Los resultados de un estudio retrospectivo en el que se evaluó el papel predictivo de IDH en 210 oligodendrogliomas, apuntan a una asociación entre la mutación del gen y el beneficio del tratamiento con PCV y radioterapia. Los pacientes con mutación de IDH tratados con quimio-radioterapia mostraron significativamente mayor supervivencia que aquellos tratados únicamente con radioterapia (9,4 años frente a 5,7 años respectivamente) [78].

En la recién publicada clasificación de la OMS de 2016, la mutación del gen de IDH se incluye como criterio para definir los astrocitomas grado II y III y los oligodendrogliomas [1].

4.2.2. CODELECCIÓN DE 1p19q.

La pérdida combinada del brazo corto del cromosoma 1 y del brazo largo del cromosoma 19 es una característica genética de los oligodendrogliomas y se considera un evento temprano en el desarrollo de estos tumores. El mecanismo que explica esta pérdida conjunta se ha postulado a través de la identificación de una traslocación centromérica o pericentromérica t(1;19)(q10;p10) tras la cual se produciría la pérdida del cromosoma derivado que contiene 1p y 19q [74].

La codelección 1p19q se presenta en el 70-90% de los oligodendrogliomas y en el 40% de los oligoastrocitomas y se considera un factor pronóstico y predictivo de respuesta a quimioterapia y radioterapia [74].

Numerosos estudios posteriores confirmaron que la presencia o ausencia de la pérdida combinada de 1p y 19q supone el factor pronóstico más importante para la supervivencia global de los pacientes con oligodendroglioma. En el caso de los oligodendrogliomas anaplásicos la mediana de supervivencia fue de más de 7 años en presencia de codeleción y de 2-3 años en ausencia de codeleción. Para los oligodendrogliomas, la mediana de supervivencia fue de 12-15 años en los pacientes con codeleción y de 5-8 años en los pacientes sin codeleción [79, 80].

Se ha visto que esta alteración se asocia a la mutación de IDH y la metilación del MGMT y es mutuamente excluyente con las mutaciones de TP53 y ATRX, propias de la estirpe astrocitaria y [74].

Estudios de secuenciación masiva han revelado recientemente la presencia de mutaciones inactivadoras de los genes CIC y FUBP1, localizados en los cromosomas 19 y 1 respectivamente. Estas mutaciones se han asociado a la codeleción 1p19q, sin embargo su papel en el desarrollo de los oligodendrogliomas y su importancia clínica están por determinar [74, 81].

Otra novedad en la última clasificación de la OMS de 2016 ha sido la inclusión de este biomarcador para la definición de los oligodendrogliomas [1].

4.2.3. MUTACIÓN DE P53.

Como se comentó anteriormente, P53 es una proteína implicada en la respuesta al estrés celular. La mutación del gen TP53 se presenta en el 50-60% de los astrocitomas de bajo grado, 40% de los oligoastrocitomas, 70% de los glioblastomas secundarios y en un pequeño porcentaje de los glioblastomas primarios [74].

El papel pronóstico de esta mutación en los gliomas difusos no está bien definido. En los gliomas de bajo grado con mutación de IDH se considera un factor de mal pronóstico de acuerdo con el estudio de Kim et al. en el que analizan 360 gliomas grado II constatando mayor supervivencia en los tumores con mutación de IDH y codeleción 1p19q frente a aquellos con mutaciones de IDH y P53 [82]. Sin embargo, esta alteración genética no parece influir en el pronóstico de los glioblastomas.

Actualmente, la expresión de p53 se emplea como biomarcador diagnóstico y se realiza de forma rutinaria por inmunohistoquímica. Sin embargo, se ha visto que no existe una buena correlación entre la expresión de la proteína y la mutación del gen para determinar el pronóstico de los tumores astrocitarios [74].

4.2.4. AMPLIFICACIÓN Y MUTACIONES DE EGFR.

El gen de EGFR se localiza en el cromosoma 7p12, codifica el receptor del factor de crecimiento epidérmico que está compuesto por un dominio extracelular de unión a ligando, una región transmembrana y un dominio citoplásmico tirosina quinasa. Tras la unión del ligando, EGFR activa su dominio tirosina quinasa induciendo su fosforilación. La fosforilación induce un incremento de la señalización y la activación de vías

intracelulares (MAPK y PI3K) promoviendo así la proliferación y supervivencia de las células (Figura I.14).

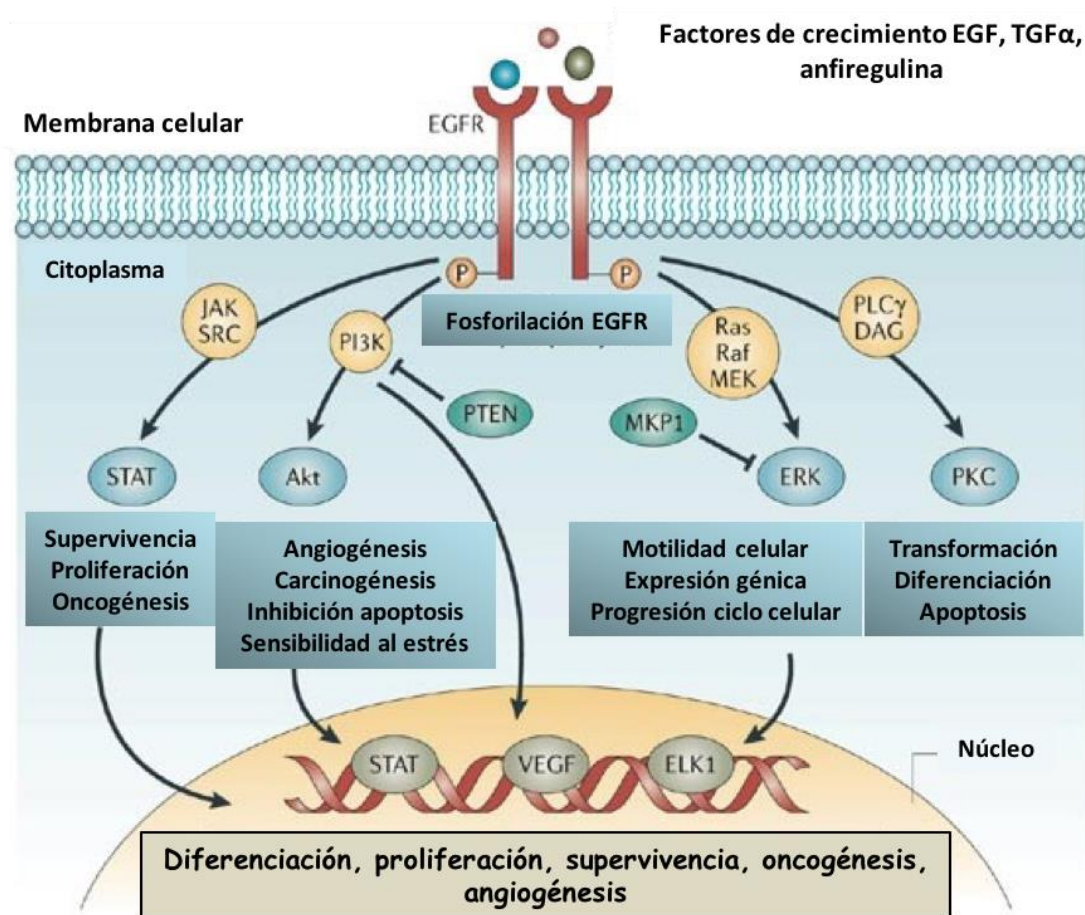


Figura I.14. Vías de señalización activadas por EGFR. Modificado de Nyati et al. 2006[83].

La alteración de EGFR más frecuente en los gliomas de alto grado es la amplificación del gen, presente en el 40% de los glioblastomas primarios. Los tumores con amplificación de EGFR pueden presentar otras alteraciones del gen, la más frecuente es EGFRvIII que consiste en una delección en bloque de los exones 2 a 7 y la consiguiente pérdida de los residuos 6 al 273 en el dominio extracelular, lo cual conduce a un receptor constitutivamente activo (Figura I.15). Esta mutación se ha identificado en el 20-30% de los glioblastomas y en el 50-60% de los glioblastomas con amplificación de EGFR [84].

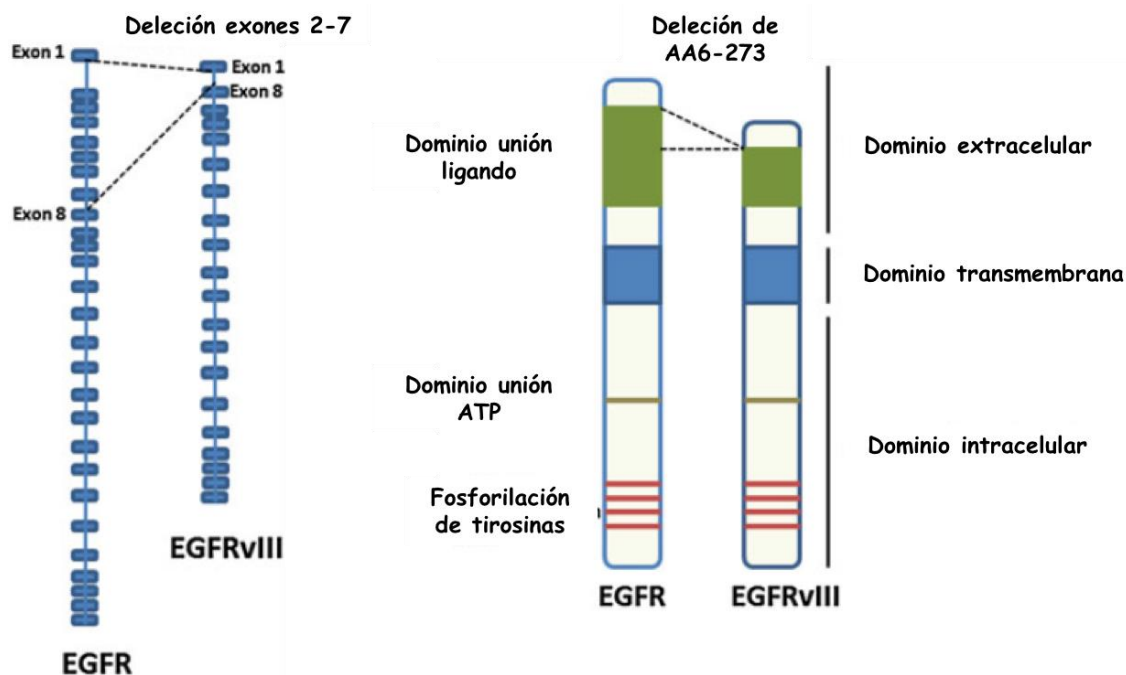


Figura I.15. Representación esquemática de EGFRvIII. Estructura DNA genómico EGFRvIII en comparación con EGFR nativo (a). Proteína EGFRvIII, delección del dominio de unión de ligando (b). Modificado de Salkeni et al. 2013[85].

Soeda et al. mostraron en líneas de células madre de glioblastoma que EGF, y no otros factores de crecimiento, se asociaba con la proliferación celular. Además, en la presencia de Gefitinib (inhibidor la actividad tirosina quinasa de EGFR), constataron un incremento en la apoptosis, una disminución en la fracción de las células madre tumorales de 6-10% a 0-0.05% y la supresión de formación de colonias en un 90% [86]. Numerosos estudios, con el fin de aclarar la implicación clínica de EGFR y EGFRvIII en los glioblastomas, mostraron resultados contradictorios. Los grupos de Smith y Houillier relacionaron estas alteraciones con mejor pronóstico y un incremento en la supervivencia[87, 88], sin embargo Simmons y Shinojima, evidenciaron un peor pronóstico en presencia de la amplificación de EGFR [89, 90], por último, Benito et al. no constataron diferencias en la supervivencia de los pacientes con glioblastoma en función del estado de EGFR [91].

En un estudio reciente, Hobbs et al. propusieron una posible relación entre el grado de amplificación de EGFR y la supervivencia en los pacientes con glioblastoma. Mostraron mayor supervivencia media en aquellos casos con altos niveles de amplificación de EGFR (EGFR : CEP7 ratio > 20 determinado mediante hibridación fluorescente in situ) en comparación con los pacientes sin amplificación o bajos-moderados niveles de amplificación de EGFR [92].

4.2.5. METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN DEL MGMT.

El gen MGMT, localizado en el cromosoma 10q26, codifica la enzima O6-metil-guanina-ADN metiltransferasa (MGMT), encargada de mantener la integridad del ADN mediante la eliminación los grupos alquilo de la posición O6 de la guanina en las células expuestas a agentes alquilantes (Figura I.16).

En el proceso de reparación, por cada grupo alquilo se pierde una molécula de MGMT que se inactiva, por lo tanto la capacidad de reparación del ADN de una célula depende del número de moléculas de MGMT y de su tasa de síntesis de novo [74].

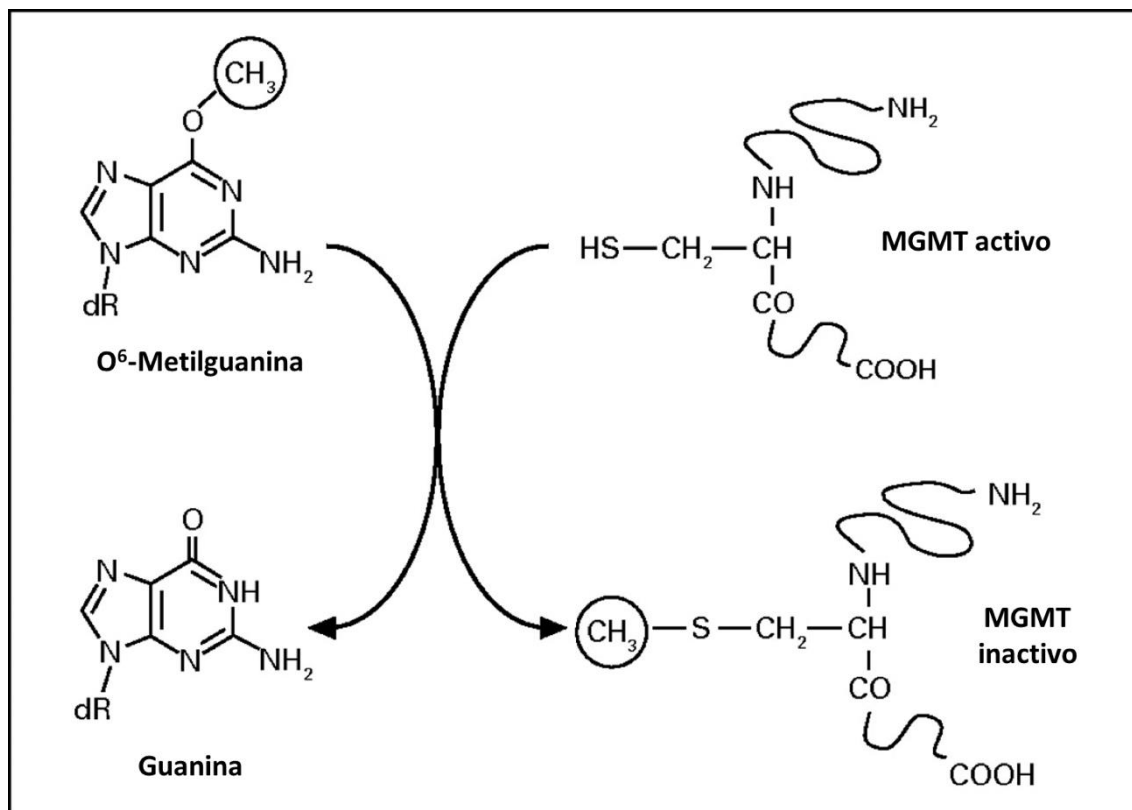


Figura I.16. Mecanismo de reparación de MGMT. Modificado de Hegi et al. 2008 [93].

La metilación del promotor del gen de MGMT causa su silenciamiento, inhibiendo por tanto la síntesis de la enzima y su función reparadora. Así cuando el promotor está metilado, las células son más sensibles a los agentes alquilantes.

La metilación de MGMT se ha asociado a la mutación del gen de IDH y a la codeleción 1p19q [94] y no se ha identificado una asociación de este marcador ni con la mutación de p53 ni con la amplificación de EGFR [95].

Se ha identificado metilación de MGMT en el 60-80% de los oligodendrogliomas, el 60-70% de los oligastrocitomas, 20-45% de los glioblastomas y el 40-50% de los astrocitomas anaplásicos [74].

Numerosos ensayos clínicos han demostrado la importancia de la determinación de este biomarcador en el estudio de los gliomas desde un punto de vista pronóstico y predictivo. En el estudio llevado a cabo por EORTC/NCIC se evidenció metilación de

MGMT en el 45% de los glioblastomas analizados, la mediana de supervivencia global fue de 18.2 meses para los pacientes con metilación frente a 12.2 meses para aquellos sin metilación, independientemente del tratamiento. En los casos metilados, la supervivencia a los 2 años fue del 46% en el grupo tratado con Temozolamida y radioterapia y del 22.7% en aquellos tratados únicamente con radioterapia [96].

Reifenberger et al. analizaron 223 glioblastomas en pacientes mayores de 70 años evidenciando un alta prevalencia de la metilación de MGMT en este grupo de edad, además la supervivencia libre de progresión fue mayor en los pacientes tratados con quimio-radioterapia frente a los tratados solo con radioterapia [97].

En un estudio retrospectivo de 38 glioblastomas tratados, los autores constataron en el 37% de los casos un cambio en el estado de metilación de MGMT en la segunda cirugía más frecuente en los casos metilados. Además, la supervivencia media de los pacientes se asoció únicamente al estado de MGMT en la primera cirugía [98].

La pseudoprogresión radiológica ocurre durante el tratamiento con Temozolamida, se define como un incremento en la captación de contraste acompañado o no de sintomatología clínica, seguido de mejoría y estabilización. Esto se debe a una respuesta inflamatoria local secundaria al tratamiento recibido que con un aumento de la permeabilidad vascular y formación de edema. Cuando este fenómeno aparece en pacientes con metilación de MGMT, se recomienda continuar con el tratamiento adyuvante. Sin embargo, si se presenta en pacientes sin metilación de MGMT, sugiere progresión tumoral y está indicado considerar un cambio en el esquema terapéutico [99].

4.2.6. PÉRDIDA DE ATRX.

En el 85-90% de los cánceres humanos se ha descrito un mantenimiento o alargamiento de los telómeros secundario a la reactivación de la enzima telomerasa, mientras que en un 15% es debido a una activación del alargamiento alternativo de los telómeros (ALT) independiente de telomerasa [100].

En un estudio que analiza el fenotipo ALT en varios tipos de cánceres humanos, se ha visto que el fenotipo ALT es relativamente más prevalente en los gliomas en comparación con otros tipos tumorales, presentándose en el 27% de los astrocitomas de alto grado frente a un 3,7% de los 6110 tipos de tumores estudiados [101]. Los resultados de un estudio anterior sugieren que la presencia de ALT supone un factor de buen pronóstico en los pacientes con glioma, mostrando una mayor supervivencia en los glioblastomas ALT positivos y su asociación con las mutaciones de IDH [102].

El gen ATRX (síndrome Alfa-Talasemia con retraso mental ligado a X) codifica una proteína que forma parte del complejo remodelador de la cromatina. La pérdida de expresión de esta proteína provoca una desestabilización de los telómeros activando la vía ALT. Las mutaciones de ATRX se consideran específicas de la estirpe astrocitaria, incluyendo los astrocitomas difusos y anaplásicos, y la mayoría de los

oligoastrocitomas. Es una alteración rara en los oligodendrogliomas, siendo mutuamente excluyente con la codeleción 1p19q [103].

La mayor parte de las mutaciones de ATRX detectadas a día de hoy conllevan una pérdida de expresión de la proteína, que se puede determinar mediante estudio inmunohistoquímico [103].

4.3. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS GLIOMAS DIFUSOS.

Como se comentó anteriormente, los gliomas difusos son tumores heterogéneos y dentro de un mismo tipo histológico, el pronóstico y la evolución de los pacientes puede variar considerablemente.

Durante los últimos años, numerosos estudios se han enfocado en la definición de subgrupos moleculares basados en los perfiles de expresión génica con el fin de mejorar la correlación con el pronóstico y la respuesta al tratamiento en los pacientes con glioma.

El análisis de las alteraciones genéticas en los glioblastomas ha revelado múltiples genes supresores de tumores inactivados y oncogenes activados durante la formación y progresión tumoral.

Las tres vías más implicadas en el desarrollo de los glioblastomas, descritas anteriormente, son: la vía de p53, la vía de RB y la vía RTK-RAS-PI3KA. La ganancia del cromosoma 7 junto con la pérdida del cromosoma 10 relacionadas con la amplificación de EGFR y mutación de PTEN son más frecuentes en los glioblastomas primarios. Mientras que las mutaciones de IDH, TP53 y ATRX son características de los glioblastomas secundarios. Estas mutaciones agrupan perfiles de expresión génica característicos de los subgrupos moleculares de glioblastoma descritos recientemente[75].

Gracias a los trabajos de TCGA se han identificado 4 subgrupos de glioblastoma, los subtipos proneural y mesenquimal presentan perfiles opuestos y reproducibles entre numerosos estudios.

El subtipo proneural es característico de pacientes jóvenes, muestra diferenciación neuronal y se asocia a mejor pronóstico. Se caracteriza por presentar mutaciones de IDH y TP53, el fenotipo G-CIMP y no presenta alteraciones de EGFR y PTEN. El fenotipo G-CIMP y las mutaciones de IDH son frecuentes los gliomas de bajo grado y se presentan en el 10% de los glioblastomas, correspondiente a la proporción de glioblastomas secundarios [104].

El subtipo mesenquimal es frecuente en los pacientes mayores y se asocia a peor pronóstico. Se caracteriza por pérdida o mutación de NF1, alteraciones en la señalización de Akt y aumento de expresión de los péptidos angiogénicos, además de la sobreexpresión de los genes relacionados con la motilidad, matriz extracelular y adhesión celular [104].

Los otros dos subtipos son el clásico y el neural. El subtipo clásico presenta amplificación del cromosoma 7, alteraciones de EGFR y pérdida del cromosoma 10. La delección focal homocigota de 9p21.3 coexiste con la amplificación de EGFR en el 94% de los glioblastomas de este subtipo. Por último el subtipo neural que muestra expresión de marcadores neurales y un perfil génico similar al tejido cerebral normal [104].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los gliomas difusos son la neoplasia primaria cerebral más frecuente, representan el 32% de todos los tumores cerebrales y del sistema nervioso central el 80% de los gliomas malignos primarios. A pesar de las terapias agresivas, la mayoría de los pacientes sufren recaídas y las supervivencias en pacientes con glioblastoma son de alrededor de un año.

En los últimos años la clasificación de la OMS de 2007 era el estándar internacional empleado para la gradación y clasificación de estos tumores. Este sistema se basaba únicamente en criterios morfológicos, sin embargo, se ha visto que tumores del mismo grado histológico pueden tener un curso clínico distinto con el consiguiente impacto sobre la respuesta al tratamiento y la supervivencia.

Recientemente se ha publicado la última clasificación de la OMS de 2016 en la que por primera vez, además de los criterios histológicos clásicos, se incluyen los parámetros moleculares, en concreto la mutación del gen de IDH y la codeleción 1p19q para definir y gradar los gliomas difusos. Este trabajo se ha desarrollado con el fin de demostrar que en el estudio de los gliomas difusos, los marcadores moleculares juegan un papel fundamental en la formación de grupos pronósticos, superando a los criterios histológicos clásicos y permitiendo por lo tanto un manejo terapéutico más preciso de los pacientes con glioma.

Los objetivos concretos planteados son los siguientes:

- Determinar la prevalencia de las alteraciones moleculares (mutación de IDH1, codeleción 1p19q, sobreexpresión de p53, pérdida de ATRX, amplificación de EGFR, presencia de EGFRvIII y metilación de MGMT) en una cohorte de pacientes diagnosticados de tumores gliales de grado II-IV.
- Correlacionar las alteraciones moleculares (mutación de IDH1, codeleción 1p19q, sobreexpresión de p53, pérdida de ATRX, amplificación de EGFR, presencia de EGFRvIII y metilación de MGMT) detectadas con el tipo histológico, el grado y las características clínicas de los pacientes.
- Determinar la correlación entre los distintos marcadores moleculares implicados en el pronóstico y la respuesta a tratamiento de los pacientes con gliomas difusos.
- Establecer el valor pronóstico de las alteraciones moleculares (mutación de IDH1, codeleción 1p19q, sobreexpresión de p53, pérdida de ATRX, amplificación de EGFR, presencia de EGFRvIII y metilación de MGMT) para los

pacientes con gliomas difusos (supervivencia libre de progresión y supervivencia global).

- Determinar el valor predictivo de respuesta a tratamiento del MGMT en gliomas difusos.
- Comparar los marcadores moleculares con los criterios histológicos y clínicos como factores pronósticos en los gliomas difusos.
- Definir subgrupos de gliomas difusos con características moleculares diferenciales con valor clínico y pronóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE LOS CASOS Y RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS.

Se han analizado un total de 138 gliomas difusos pertenecientes a 108 pacientes. Las muestras se han recogido de los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del hospital Fundación Jiménez Díaz, entre los años 1991 y 2014. Todos los casos han sido diagnosticados mediante la valoración de secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina.

Entre los criterios aplicados en esta fase inicial del estudio:

- Gliomas difusos supratentoriales operados en nuestro centro entre los años 1991 y 2014
- Pacientes adultos operados en nuestro centro, con un seguimiento mínimo de 48 meses independientemente del tratamiento recibido después de la cirugía.
- Pruebas de imagen concordantes con la historia clínica de los pacientes
- Muestras tisulares representativas para el estudio inmunohistoquímico y molecular.
- De las 138 muestras de gliomas difusos, 108 corresponden a tumores primarios, 28 a primeras recidivas y 2 casos a segundas recidivas.

Todas las muestras fueron fijadas en formol e incluidas en parafina, de cada caso se seleccionaron bloques representativos para realizar los estudios moleculares y las técnicas de inmunohistoquímica.

El estudio clínico está basado en la revisión y el análisis de las historias clínicas de los 108 pacientes. Se valoraron los siguientes parámetros referentes a la situación clínica del paciente: edad, sexo, índice de Karnofsky al inicio, intervención quirúrgica, utilización o no de radioterapia, administración o no de quimioterapia y fármaco utilizado para la misma, exploración neurológica tras el tratamiento quirúrgico, índice de Karnofsky tras el tratamiento quirúrgico, así como el tiempo de supervivencia desde que consultaron cada uno de los pacientes.

2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

El estudio inmunohistoquímico se realizó para la determinación de la expresión de Ki67, P53, IDH1R132H y ATRX.

El procedimiento se realizó sobre secciones de 3-5µm de las muestras tumorales que primero se colocaron en una estufa a 65°C durante una hora, con el fin de mejorar la adhesión del tejido al portaobjetos. La desparafinización y recuperación antigénica se realizaron en DAKO PT Link (20 minutos a 95°C, a PH alto en el caso de p53 y ATRX, y bajo en el caso de Ki67). A continuación, se procedió a la tinción de las muestras en el sistema automatizado DAKO Autostainer Link 48, empleando anticuerpos comerciales y diluciones recogidos en la Tabla III.1, y como sistema de visualización se empleó el Kit DAKO EnVision™ FLEX. Los pasos de tinción y contratinción fueron los siguientes:

- Lavado (EnVision™ FLEX Wash Buffer).
- Inhibición de la peroxidasa endógena 5 minutos (EnVision™ FLEX Peroxidase Blocking Reagent).
- Lavado (EnVision™ FLEX Wash Buffer).
- Anticuerpos primarios (Tabla III.1).
- Lavado (EnVision™ FLEX Wash Buffer).
- Anticuerpo secundario 20 minutos (EnVision™ FLEX/HRP).
- 2 lavados (EnVision™ FLEX Wash Buffer).
- Revelado 10 minutos (EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen).
- Lavado (EnVision™ FLEX Wash Buffer).
- Contratinción 5 minutos (EnVision™ FLEX Hematoxylin).
- Lavado (EnVision™ FLEX Wash Buffer).

En el caso de IDH1 el estudio inmunohistoquímico se realizó en la plataforma automatizada BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems). El desparafinado y recuperación antigénica con CC2 a Ph6 durante 56 minutos se realizaron de manera automatizada en el BenchMark ULTRA. El anticuerpo fue incubado durante 30 minutos a 37° C. La detección antigénica se realizó con Ultraview Universal DAB Detection Kit. Las muestras fueron contrateñidas con Hematoxilina durante 8 minutos y Blue Reagent durante 4 minutos.

Anticuerpo	Clon	Incubación (minutos)	Dilución	Casa comercial	Tinción
Ki67	MIB-1	20	Prediluido	Dako	Nuclear
P53	D07	20	Prediluido	Dako	Nuclear
ATRX	HPA001906	30	1:300	Sigma Aldrich	Nuclear
IDH1R132H	H09	30	Prediluido	Master Diagnostics	Citoplasmática

Tabla III. 1. Anticuerpos primarios empleados en el estudio inmunohistoquímico.

Después de finalizar la tinción en las plataformas automatizadas se procedió al lavado, deshidratación y montaje de las preparaciones según los procedimientos habituales.

Para el análisis de la expresión de los marcadores, en el caso de ki67, p53 y ATRX se cuantificó el porcentaje de células teñidas. Se consideró p53 positivo cuando más del 50% de las células tumorales mostraron tinción nuclear. La pérdida de ATRX se valoró como una ausencia de tinción en más del 10% de las células tumorales.

En el caso de IDH1, se valoró la presencia o ausencia de tinción para indicar la presencia o ausencia de la mutación IDH1R132H respectivamente.

La validación inmunohistoquímica de los anticuerpos IDH1R132H y ATRX se realizó probando cada anticuerpo en 4 diluciones/concentraciones sobre un microarray tisular formado por múltiples gliomas cerebrales y otros tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, permitiendo así obtener una visión general del comportamiento del anticuerpo en cuanto a sensibilidad, especificidad frente a los distintos tipos celulares y nivel de fondo inespecífico.

3. HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH).

La técnica empleada para la detección de la codeleción 1p19q y la amplificación de EGFR fue la hibridación fluorescente in situ (FISH), empleando de 3 µm de las muestras tumorales que se mantuvieron en estufa a 65°C durante 2 horas. Los pasos de la técnica de hibridación fueron los siguientes:

- Desparafinización y rehidratación:

Lavado con xilol 10 minutos.

Lavado con alcohol 6 minutos.

- Pretratamiento:

Sumergir las preparaciones en una olla con la solución de desenmascaramiento Dako REALTM Target Retrieval Solution durante 4 minutos.

- Digestión enzimática:

Pepsina “Vysis Protease”, previamente reconstituida, durante 10 minutos a 37°C en cámara húmeda.

Dos lavados SSC 2x (solución de citrato de sodio) 5 minutos.

Deshidrataron en alcoholes de graduación ascendente.

- Hibridación:

Aplicar 10 µl de sonda en cada sección de tejido, en el caso de 1p19q, las sondas empleadas fueron LSI 1p36/1q25 y LSI 19p13/19q13 (Vysis, Abbott Molecular, Illinois, USA), y para EGFR LSI EGFR/CEP7 (Vysis, Abbott Molecular, USA).

Desnaturalización 5 minutos a 85°C.

Hibridación durante toda la noche a 37°C en un hibridador.

➤ Lavado:

Lavado en SSC 2x NP 40 0.3%, 2 minutos a 73°C.

Lavado en SSC 2x NP 40 0.3%, 2 minutos a temperatura ambiente.

Contratinción con DAPI 10 µl.

La lectura de la técnica se realizó en un microscopio de fluorescencia, se contabilizaron las señales en al menos 80 núcleos aproximadamente, y se consideró pérdida de 1p y 19q cuando se observaron dos señales verdes y una roja, o cuatro señales verdes y dos rojas, en más de un 50% de las células analizadas [105]. En el caso de EGFR, se consideró amplificación del gen cuando más del 10% de las células presentaron un ratio EGFR : CEP7 \geq 2 [106]. (Tabla III.2)

1p19q	
Contaje	80 núcleos
Patrón codelección	Ratio 1p36/1q25 \leq 2 y 19p13/19q13 \geq 2
Presencia de codelección	\geq 50% con delección de 1p y 19q
EGFR	
Contaje	80 núcleos
Patrón de amplificación	Ratio EGFR/CEP7 \geq 2
Presencia de amplificación	\geq 10% con amplificación de EGFR

Tabla III. 2. Criterios de evaluación de 1p19q y EGFR por FISH.

4. PIROSECUENCIACIÓN.

Mediante la técnica de pirosecuenciación se realizaron las determinaciones de la mutación del gen de IDH1, la metilación del promotor del gen del MGMT, y la presencia de EGFRvIII.

4.1. ESTUDIO DE MUTACIÓN DE IDH1.

4.1.1. EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN.

La extracción de ADN se realizó empleando el kit comercial de QIAGEN “QIAamp FFPE Tissue” partiendo de 3-5 cortes de 10µm de espesor de las muestras incluidas en parafina.

Para la desparafinización e hidratación de la muestra, se realizaron 2 pases de xilol y de alcohol consecutivamente, centrifugando las muestras, a 13000 rpm durante 3 minutos, después de cada pase y retirando el sobrenadante. Posteriormente se incubaron a 56°C durante 20 minutos hasta evaporar todo el etanol.

Para la digestión enzimática se incubaron las muestras en tampón ATL y Proteinasa K a 56°C durante toda la noche. Al día siguiente se incubaron a 90°C durante 1 hora para deshacer las modificaciones o alteraciones que ocasiona el formol en los ácidos nucleicos.

Por último, después de añadir el tampón AL y el etanol, se procedió a la extracción empleando las columnas QIAamp MinElute y realizando lavados con los tampones AW1 y AW2. Se eluyó en 50 µl de agua ultrapura.

Una vez obtenido el ADN, la concentración se valoró por absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

A partir del ADN extraído se realizó la amplificación de IDH1 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para su posterior análisis por pirosecuenciación. La PCR se efectuó en un volumen de 20 µl que incluye 2µl de ADN (50 ng) y 18 µl de Master mix (Taq polimerasa, dNTPs, cebador directo y cebador reverso marcado con biotina), se empleó el termociclador 2720 Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización a 95°C durante 10 minutos seguida de 95°C durante 10 segundos y 30 segundos a 60°C durante 45 ciclos y se mantiene a 4°C.

4.1.2. PIROSECUENCIACIÓN.

Para la determinación de todas las mutaciones del codón 132 del gen de IDH1 se empleó la técnica de pirosecuenciación. Esta técnica consiste en la detección de la incorporación secuencial de nucleótidos durante la síntesis del ADN. Los pasos para realizar la técnica fueron los siguientes:

- En una placa de 24 pocillos (Thermo Scientific, 0,2 ml-24 well PCR plate) añadir 10 µl del producto de amplificación y 70 µl de Streptavidina-Sefarosa diluida en un tampón de unión.
- Incubación de la placa en agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos con el fin de fijar el ADN biotilado a la Streptavidina.
- Lavado y desnaturalización en estación de vacío Pyromark Q24.
- En una placa de secuenciación (Pyromark Q24 Plate 100) transferir el ADN desnaturalizado con un tampón de annealing y el cebador de secuenciación.
- Incubar a 80°C durante 2 minutos.
- Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos para facilitar la unión del cebador.

- Pirosecuenciación en Pyromark Q24 durante la cual se produce la incorporación de los nucleótidos, esto conlleva una reacción enzimática en cascada que permite detectar cada nucleótido incorporado en forma de señal lumínica que se visualiza en un pirograma.

Para la validación de la técnica de pirosecuenciación se emplearon DNA genómico comercial (COT Human DNA, Roche) y DNA genómico de parafina de muestras de cerebro normal, oligodendrogliomas y glioblastomas a distintas concentraciones. La especificidad de los cebadores se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se empleó el estudio inmunohistoquímico con el anticuerpo IDH1R132H para confirmar los resultados de mutación del gen de IDH1 por pirosecuenciación y establecer los puntos de corte de la técnica.

En la siguiente tabla se especifican las secuencias de los cebadores empleados para la amplificación y la secuenciación (Tabla III.3).

Cebador	Secuencia
Directo	GAGAAGAGGGTTGAGGAGTTC
Reverso	[Btn]GCCAACATGACTTACTTGATC
Secuenciación	GGGTAAAACCTATCATCAT

Tabla III. 3. Secuencias de los cebadores de IDH1 empleados para la amplificación y la secuenciación del gen.

4.1.3. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

En cada serie analítica se incluyó una muestra de control, que presenta un genotipo nativo en la región sometida a secuenciación, necesaria para realizar una correcta interpretación de los resultados, además de un control negativo sin ADN molde para detectar posibles contaminaciones.

El análisis de las mutaciones se realizó con el software Pyromark Q24 que permite indicar la secuencia del codón a estudio en forma de porcentajes de ácidos nucleicos (Figura IV.9). El punto de corte establecido para considerar mutación del gen de IDH1 fue del 15% con respecto a la muestra de control.

4.2. ESTUDIO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN DE MGMT.

4.2.1. TRATAMIENTO DEL ADN CON BISULFITO Y PURIFICACIÓN.

Con el bisulfito sódico se produce la conversión de las citosinas no metiladas a uracilo, mientras que las citosinas metiladas permanecen, permitiendo así su identificación mediante pirosecuenciación en forma de Timinas.

Para realizar la conversión del ADN extraído, se empleó el kit comercial EPITECT Fast DNA Bisulfite (QIAGEN). En una primera fase de tratamiento se mezcló el ADN con la solución de bisulfito y un tampón protector del ADN, después en un termociclador se llevó a cabo el siguiente programa de ciclos para la conversión del ADN: desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, incubación a 60°C durante 20 minutos, desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, incubación a 60°C durante 20 minutos y se mantiene a 20°C. La segunda fase de purificación consistió en la unión del ADN a un soporte de tipo columna y la eliminación de las sales. La conversión a Uracilo se completó mediante desulfonación alcalina, tras la que se purificó de nuevo el producto para eliminar las sales.

4.2.2. REACCIÓN DE PCR.

Para la PCR se empleó el kit comercial MGMT Pyro (QIAGEN), la reacción se llevó a cabo en 25 µl bajo las siguientes condiciones:

- Activación inicial a 95°C durante 15 minutos.
- Desnaturalización a 95°C 20 segundos, anillamiento a 53°C 30 segundos y extensión a 72°C 20 segundos por 42 ciclos.
- Extensión final a 72°C durante 5 minutos.

El producto de amplificación se empleó para la pirosecuenciación siguiendo el mismo protocolo indicado anteriormente.

4.2.3. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Para el análisis de la metilación de MGMT también se empleó el Software Pyromark Q24. En cada serie analítica se incluyó un control positivo de metilación.

El pirograma en el caso de MGMT refleja el estatus de metilación de cuatro islas CpG del promotor del gen de MGMT, el porcentaje de metilación corresponde al porcentaje de citosinas metiladas no convertidas a uracilo durante el tratamiento con el bisulfito (Figura IV.15). Se consideró metilación del promotor del gen de MGMT cuando el porcentaje de metilación fue igual o superior al 8%.

4.3. DETECCIÓN DE EGFRVIII.

4.3.1. EXTRACCIÓN DE ARN.

La extracción de ARN se realizó empleando el kit comercial de QIAGEN “RNeasy FFPE kit” partiendo de 3-5 cortes de 10 µm de espesor de las muestras incluidas en parafina. La fase inicial de desparafinización consistió en 1 pase de xilol y otro de alcohol, después de cada pase se centrifugaron las muestras a máxima velocidad durante 4 minutos. Después se incubaron a 56°C durante 5 minutos.

Para la digestión enzimática se añadieron 240 µl de tampón PKD y 10 µl de proteinasa K para proceder posteriormente a su incubación a 56°C en agitación (550 rpm) durante toda la noche.

Al día siguiente, para inactivar la proteinasa se incubaron las muestras en hielo durante 3 minutos, y después se centrifugaron (13500 rpm) durante 15 minutos a 4°C. Tras transferir el sobrenadante y añadir 25 µl de DNase Booster Buffer y 10 µl de DNase I stock solution para eliminar el ADN, se incubaron las muestras a 25°C durante 15 minutos.

Por último, después de añadir el tampón RBC y el etanol, se procedió a la extracción empleando las columnas RNeasy MinElute y realizando lavados con el tampón RPE. Se eluyó en 30 µl de agua ultrapura.

Una vez obtenido el ARN, la concentración se valoró por absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.3.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)-PCR.

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo empleando el kit comercial Transcriptor Universal cDNA Master (Roche). En cada tubo de reacción se añadieron 15 µl de ARN y 5 µl de Master mix (tampón y enzima retrotranscriptasa). La reacción de retrotranscripción se realizó en un termociclador 2720 Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones:

- Anillamiento 25°C, 5 minutos.
- Retrotranscripción 55°C, 15 minutos.
- Inactivación 85°C, 5 minutos.

Como producto final se obtuvieron 1000 ng de ADNc (ADN complementario) de cada muestra en un volumen de total de 20 µl a una concentración de 50 ng/µl.

Una vez obtenido el ADNc, se realizaron los mismos pasos indicados anteriormente para la mutación de IDH1 (PCR y pirosecuenciación). En el caso de EGFRvIII los cebadores empleados fueron los siguientes (Tabla III.4):

Cebador	Secuencia
Directo	CGAGTCGGGCTCTGGAGG
Reverso	[B _{tn}]CACTTCTTACACTTGCGGAC
Secuenciación	GGCTCTGGAGGAAAAGAAA

Tabla III. 4. Secuencias de los cebadores de EGFRvIII empleados para la amplificación y la secuenciación del gen.

4.3.3. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

En análisis del pirograma se realizó con el Software Pyromark Q24. Se consideró la presencia de EGFRvIII cuando se detectó la fusión del exón 1 al exón 8 como se indica en la Figura IV.14.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 13.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

Todas las variables consideradas fueron sometidas previamente a un estudio estadístico descriptivo básico.

Se ha establecido la correlación entre las variables clínicas, histológicas y moleculares por medio de tablas de contingencia aplicando el test de la Chi-cuadrado o mediante la prueba del estadístico exacto de Fisher. Se tomó como valor estadísticamente significativo $p < 0.05$.

La supervivencia global (SG) se definió como el tiempo desde el diagnóstico del tumor a la fecha de fallecimiento o pérdida de seguimiento. La supervivencia libre de progresión (SLP) se definió como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico del tumor hasta el primer evento acontecido, considerándose como eventos posibles: recaídas, muerte o pérdida de seguimiento.

Las comparaciones de supervivencia de Kaplan-Meier se realizaron con la prueba de Mantel-Cox. El modelo de riesgo proporcional de Cox se ajustó considerándose parámetros significativos en el análisis univariante. La consideración estadísticamente significativa se fijó en un valor de $p < 0,05$.

El análisis multivariante se hizo con el modelo de regresión de Cox, con el fin de determinar el valor pronóstico independiente de cada una de las variables estudiadas.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA DE LA SERIE.

Los 108 casos de gliomas difusos se correspondieron a 68 (63%) glioblastomas (GBM), 12 (11,1%) astrocitomas anaplásicos (AA), 9 (8,3%) astrocitomas difusos (AD), 4 (3,7%) oligodendrogliomas anaplásicos (OA) y 15 (13,9%) oligodendrogliomas (O) (Figura VI.1).

El tipo histológico predominante fue el astrocitario con 89 casos (82,4%), de los cuales 68 casos fueron glioblastomas, frente a 19 oligodendrogliomas (17,6%). En cuanto al grado histológico, 24 gliomas fueron grado II (22,2%), 16 gliomas grado III (14,8%) y 68 gliomas grado IV (63%).

Las 28 muestras de primera recidiva correspondieron a 1 astrocitoma difuso (3,6%), 4 astrocitomas anaplásicos (14,3%), 15 glioblastomas (53,6%), 5 oligodendrogliomas (17,8%) y 3 oligodendrogliomas anaplásicos (10,7%). Las 2 muestras de segunda recidiva fueron glioblastomas.

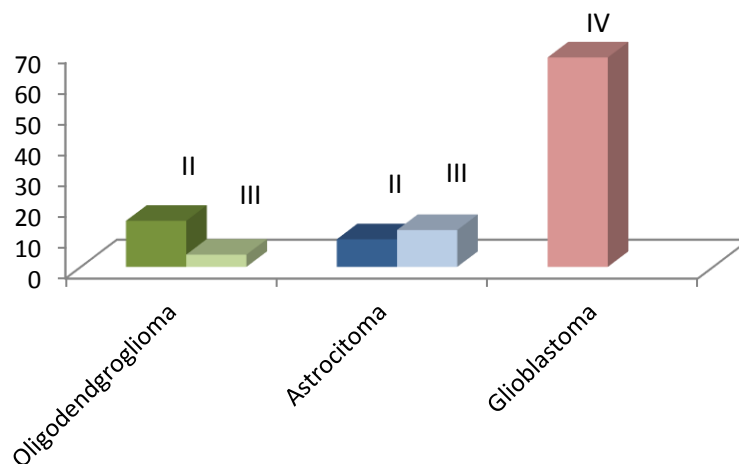


Figura IV.1. Distribución de los casos en función del tipo y grado histológico.

La distribución por sexo fue de 43 mujeres (39,8%) y 65 hombres (60,2%). El rango de edad de los pacientes estuvo comprendido entre 23 y 82 años, con una media de edad de 53 años y una mediana de 52 años.

En función de la localización del tumor, la distribución fue de: 44 casos (44,4%) en lóbulo frontal, 36 casos (33,3%) en lóbulo temporal, 16 casos (14,8%) en lóbulo parietal, 7 casos (6,5%) en estructuras profundas (cuerpo calloso, tálamo y ganglios basales) y 1 caso (0,9%) en lóbulo occipital (Figura IV.2).

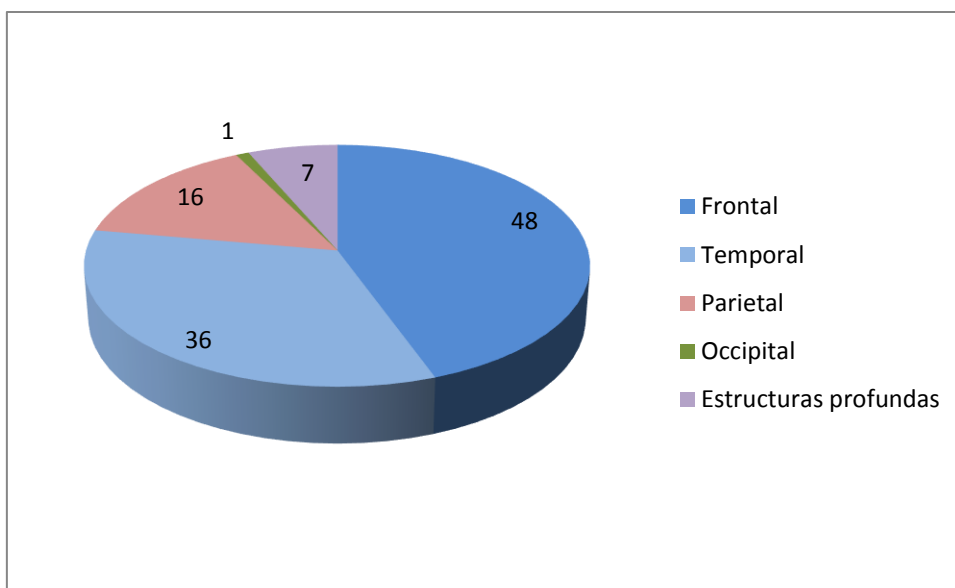


Figura IV.2. Distribución de los casos en función de la localización.

Respecto al tipo de cirugía, en 68 casos (63%) se realizó una resección macroscópicamente completa, en 19 casos (17,6%) la resección fue parcial y en 21 casos (19,4%) se realizó una biopsia estereotáctica.

Después de la cirugía o biopsia, 55 pacientes (50,9%) se trataron con radioterapia y quimioterapia, 19 pacientes (17,6%) solo con radioterapia, 6 pacientes (5,6%) únicamente con quimioterapia y 27 pacientes (22,4%) no recibieron tratamiento adyuvante postquirúrgico.

La Temozolamida se empleó como agente quimioterápico en el 96,7% de los casos, el resto de los pacientes se trataron con la combinación PCV.

En un único caso no disponemos de la información sobre el tratamiento recibido tras la cirugía.

Se objetivó recaída tumoral radiológica o confirmada mediante histología en el 38% de los casos.

El 48,1% de los pacientes fallecieron por el tumor.

2. ASOCIACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS.

2.1. EDAD Y SEXO.

La siguiente tabla muestra la distribución del sexo y de la edad en función del tipo y el grado histológico (Tabla IV.1).

	AD	AA	GBM	O	OA
Nº casos	9	12	68	15	4
Mediana edad (rango) años	38 (25-58)	45 (31-80)	59 (30-82)	32 (23-61)	42 (35-49)
Hombre/Mujer	4/5	9/3	41/27	9/6	2/2

Tabla IV.1. Distribución de la edad y el sexo en función de las características histológicas.

El grupo de pacientes mayores de 50 años (n=60) estuvo compuesto por 5 astrocitomas (8,3%), 3 oligodendrogliomas (5%) y 52 glioblastomas (86,7%), siendo estos últimos los más frecuentes en este grupo de edad. Entre los menores de 50 años (n=48) se encontraron 16 astrocitomas (33,3%), 16 oligodendrogliomas (33,3%) y 16 glioblastomas (33,3%). Las diferencias en la distribución de la edad por tipo histológico fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$) (Tabla IV.2).

La distribución de la edad en función del grado histológico igualmente mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$). En los pacientes mayores de 50 años fueron más frecuentes los gliomas de grado IV (86,7%, n=52), mientras que en los pacientes más jóvenes fueron más frecuentes los gliomas de grado II (41,7% n=20) (Tabla IV.3).

		EDAD				p
		<50 años (n=48)		≥50 años (n=60)		
		N	%	N	%	
Tipo histológico	Astrocitoma	16	33,3	5	8,3	<0,001
	Oligodendroglioma	16	33,3	3	5	
	Glioblastoma	16	33,3	52	86,7	

Tabla IV.2. Distribución de los grupos de edad (≥50 años y < 50 años) en función del tipo histológico.

		EDAD				p
		<50 años (n=48)		≥50 años (n=60)		
		N	%	N	%	
Grado histológico	II	20	41,7	4	6,7	<0,001
	III	12	25	4	6,7	
	IV	16	33,3	52	86,7	

Tabla IV.3. Distribución de los grupos de edad (≥50 años y < 50 años) en función del grado histológico.

2.2. LOCALIZACION.

Los astrocitomas difusos y los oligodendrogliomas presentaron una localización a nivel frontal y temporal, mientras que los 7 tumores localizados en estructuras profundas fueron principalmente GBM (6 casos) y un astrocitomas anaplásico, las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,013$) (Tabla IV.4).

LOCALIZACIÓN											
	Frontal (n=48)		Temporal (n=36)		Parietal (n=16)		Occipital (n=1)		Estructuras profundas (n=7)		p
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
AD	3	33,3	6	66,7	0	0	0	0	0	0	0,013
AA	5	41,7	4	33,3	1	8,3	1	8,3	1	8,3	
GBM	24	35,3	23	33,8	15	22,1	0	0	6	8,8	
O	12	80	3	20	0	0	0	0	0	0	
OA	4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabla IV.4. Distribución de la localización tumoral en función del diagnóstico histológico.

2.3. TRATAMIENTO.

Las siguientes figuras reflejan el manejo quirúrgico (Figura IV.3) y adyuvante (Figura IV.4) en función del diagnóstico histológico. Se realizó cirugía macroscópicamente completa en el 77,8% de los AD, el 41,7% de los AA, el 66,2% de los GBM, el 46,7% de

los O y el 100% de los OA. Se realizó cirugía parcial en el 22,2% de los AD, el 41,7% de los AA, el 7,3% de los GBM y el 46,7% de los O. Se realizó biopsia estereotáctica en el 16,6% de los AA, el 26,5% de los GBM y en el 6,6% de los O.

En cuanto al tratamiento adyuvante, se empleó radioterapia y quimioterapia en el 58,4% de los AA, el 64,2% de los GBM, 20% de los O y en el 50% de los OA. Se empleó únicamente radioterapia en el 44,4% de los AD, el 25% de los AA, el 14,9% de los GBM, el 6,7% de los O y el 25% de los OA. Se empleó únicamente quimioterapia en el 8,3% de los AA, el 1,5% de los GBM, el 26,6% de los O. En el 55,6% de los AD, el 8,3% de los AA, el 19,4% de los GBM, el 46,7% de los O y el 25% de los OA no se empleó ningún tratamiento adyuvante.

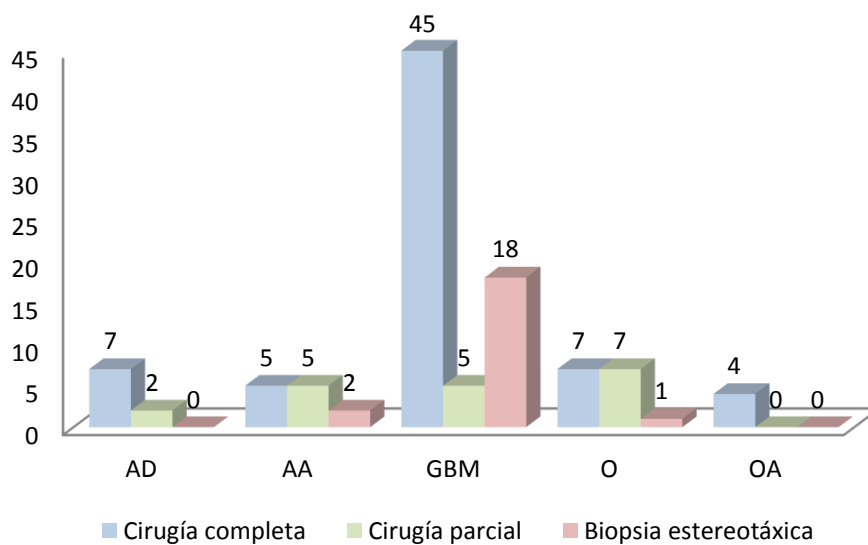


Figura IV.3. Tipo de cirugía en función del diagnóstico histológico.

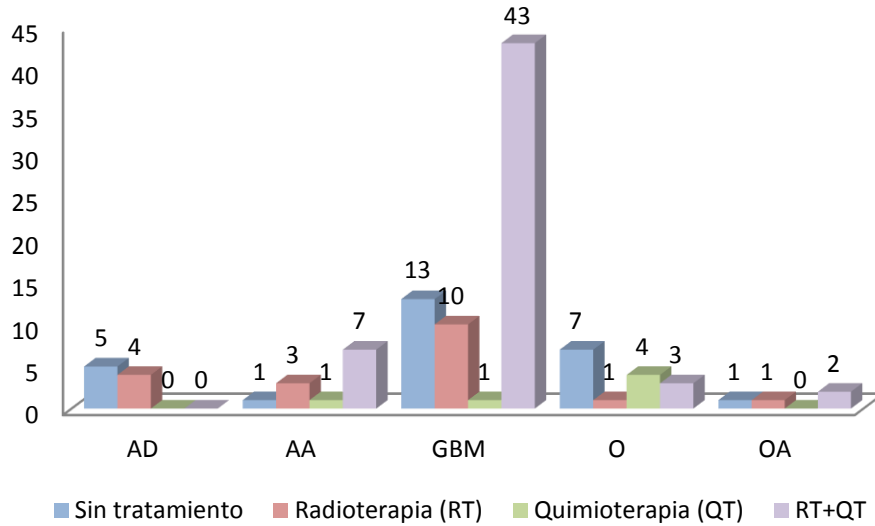


Figura IV.4. Tratamiento adyuvante en función del diagnóstico histológico.

2.4. SUPERVIVENCIA.

El porcentaje de recaída por tipo histológico fue del 55,5% en AD (5/9 casos), 25% en AA (3/12 casos), 60% en O (9/15 casos), 0% en OA (0/4 casos) y 30,9% en GBM (21/68 casos) (Figura IV.5).

El porcentaje de fallecimientos en función del tipo histológico fue de 11,1% en AD (1/9 casos), 41,7% en AA (5/12 casos), 6,7% en O (1/15 casos), 0% en OA (0/4 casos) y 66,2% en GBM (45/68 casos) (Figura IV.5).

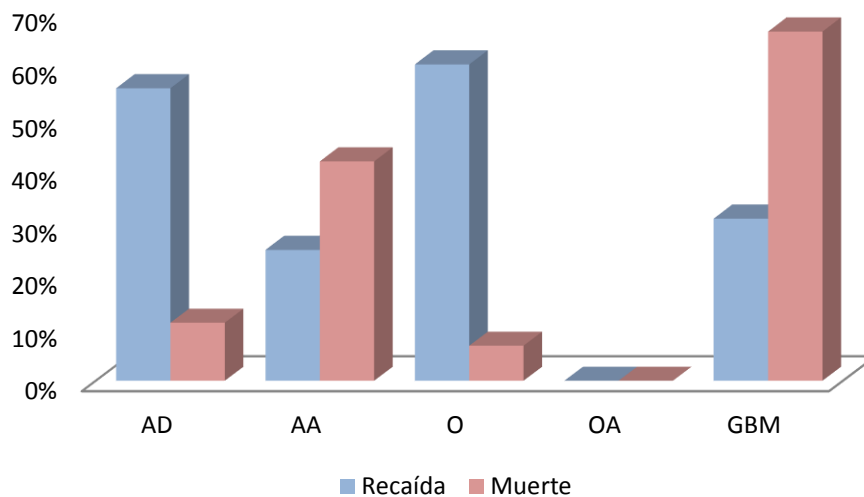


Figura IV.5. Recaídas y muertes en función del diagnóstico histológico.

3. ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN MEDIANTE KI67.

Se empleó el estudio inmunohistoquímico para determinar el índice de proliferación de los tumores de nuestra serie (Figura IV.6).

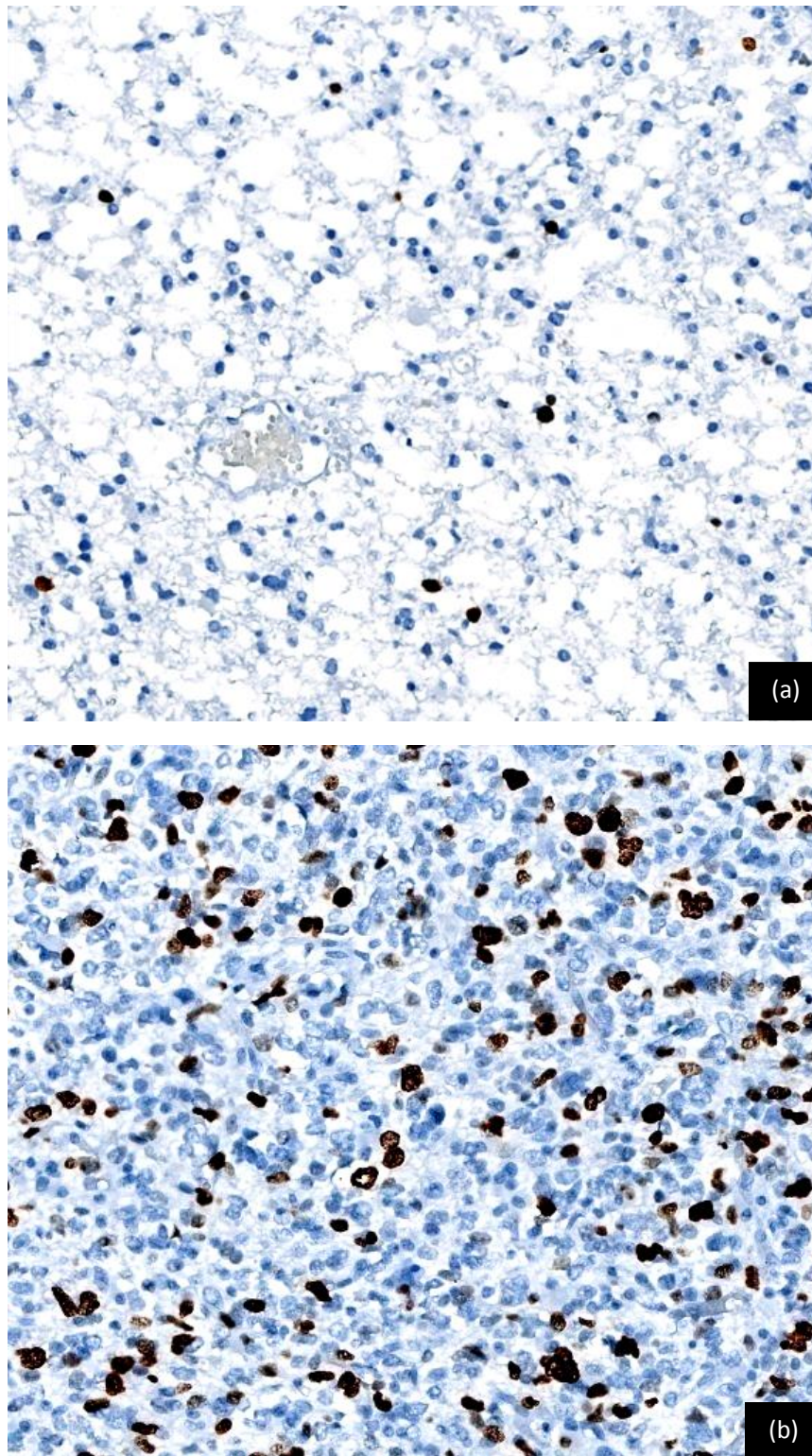


Figura IV.6. Técnica de IHQ para el estudio del índice de proliferación Ki67, tinción nuclear en oligodendroglioma (a) y glioblastoma (b). Imagen a 200x. Revelado con DAB.

La cuantificación de la inmunoreactividad frente al antígeno Ki67 fue representada en forma de porcentaje del total de las células valoradas (Tabla IV.5).

	Mediana Ki67	Media Ki67	IC [5-95%]
AD	4	11	8-14
AA	15	19	10-28
GBM	30	33	28-37
O	5	7	4-11
OA	9	14	8-20

Tabla IV.5. Índice de proliferación Ki67 en función del diagnóstico histológico.

El índice de proliferación aumentó con el grado histológico ($p < 0.001$) y fue mayor en astrocitomas que en oligodendrogliomas (Figura IV.7).

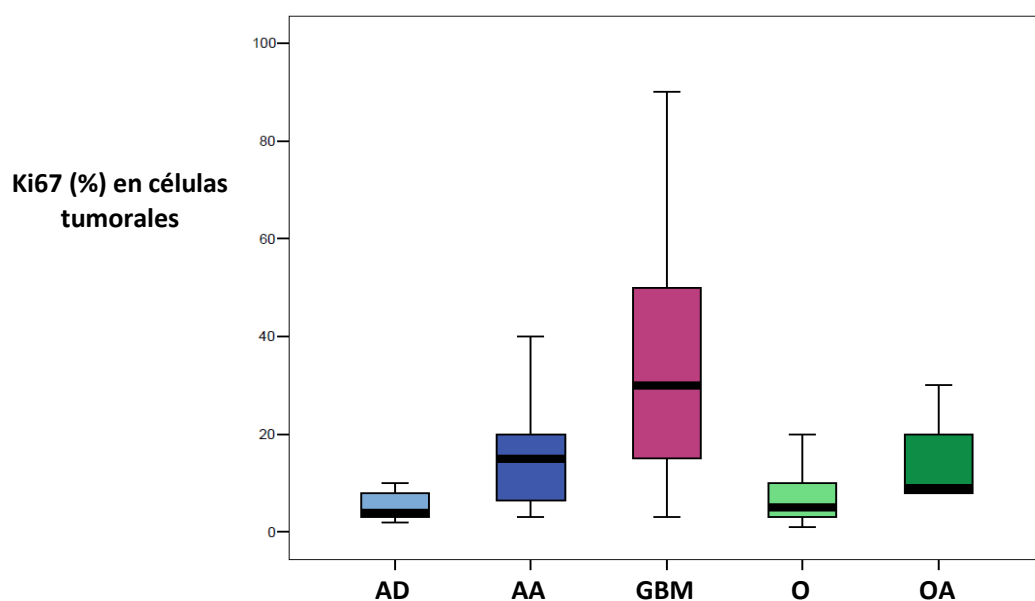


Figura IV.7. Distribución del índice de proliferación Ki67 en función del diagnóstico histológico ($p < 0.001$).

4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

4.1. MUTACIÓN DE IDH1.

Se detectó mutación del gen de IDH1 en 33 casos (30,6%) casos, 75 casos (69,4%) no presentaron esta mutación mediante el estudio inmunohistoquímico, 29 casos (27%)

presentaron expresión de la proteína IDH1R132H frente a 79 casos negativos (73%) (Figura IV.8).

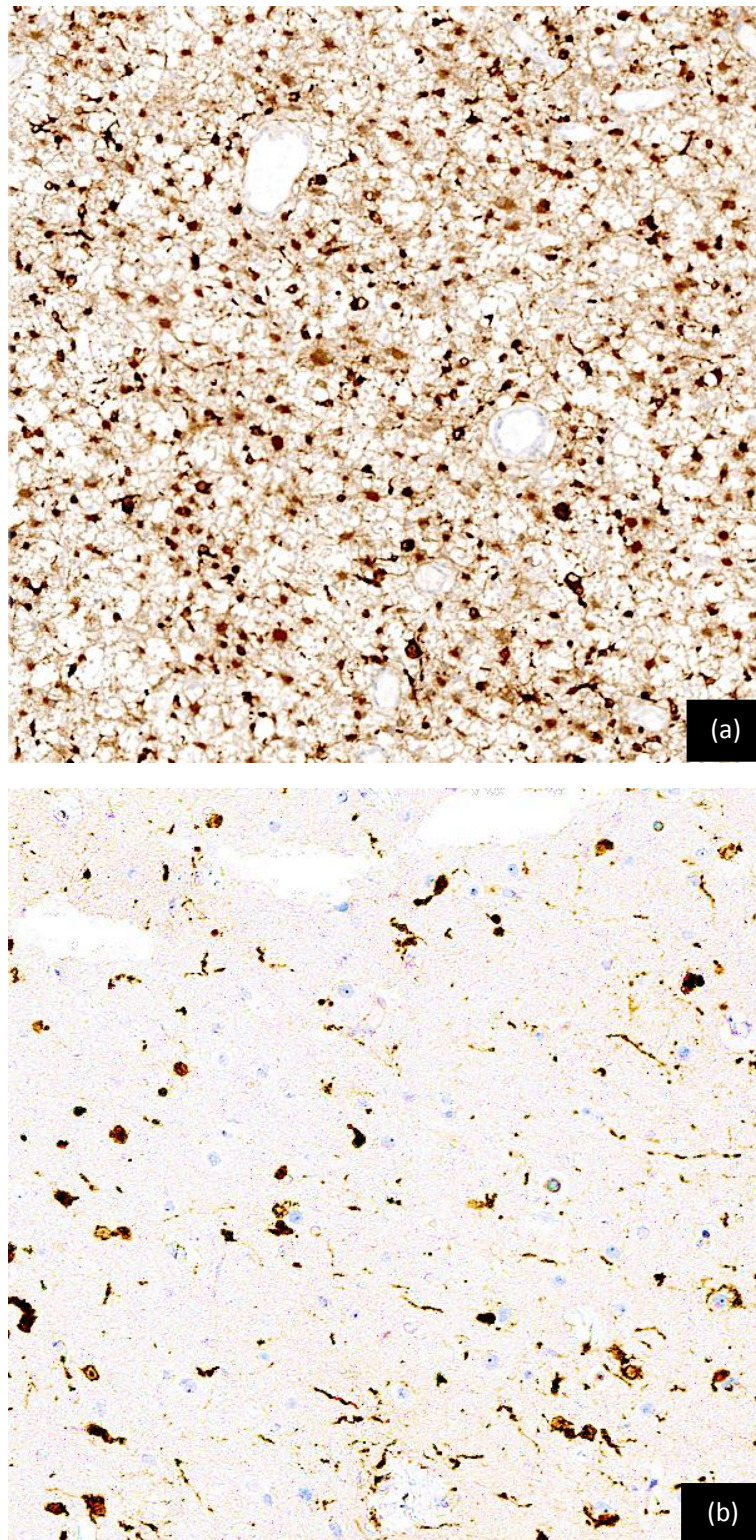


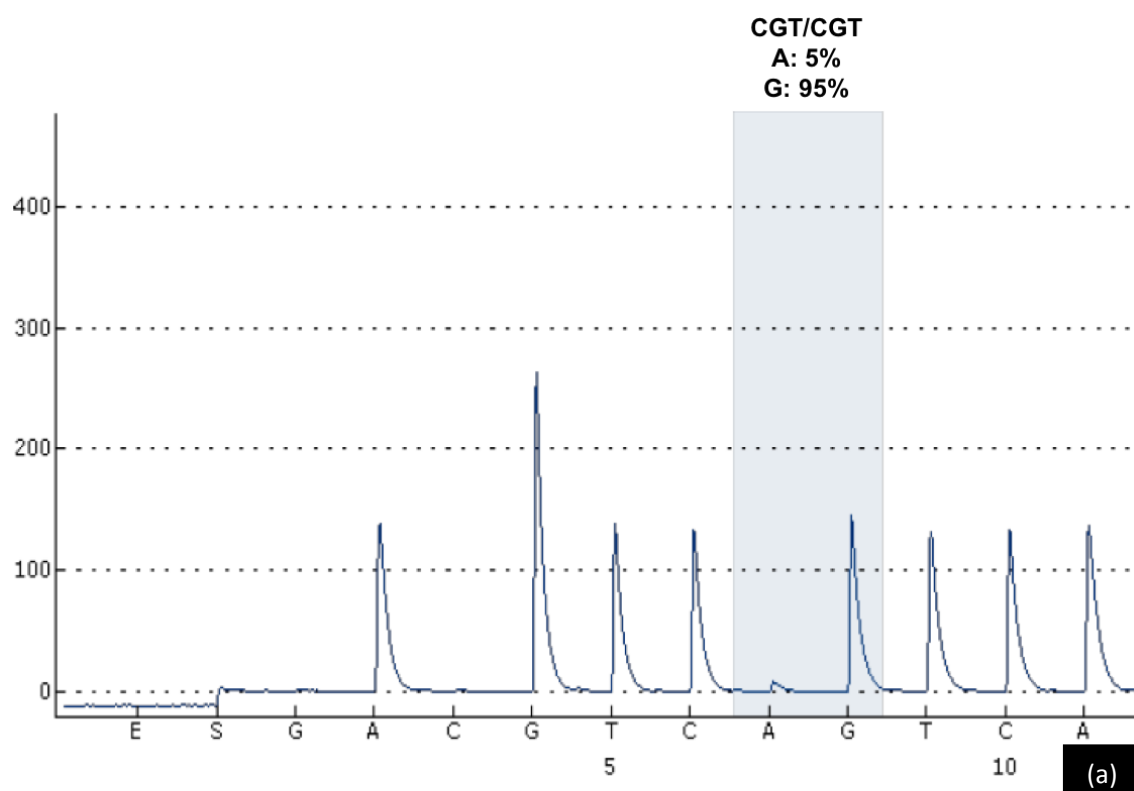
Figura IV.8. Determinación de la mutación IDH1R132H mediante técnica de IHQ. Expresión homogénea, nuclear y citoplásmica, de la proteína mutada en las células tumorales (a), infiltración de parénquima cerebral por glioma con mutación de IDH1R132H, se observa tinción en las células tumorales y ausencia de tinción en las células no neoplásicas del parénquima cerebral infiltrado (b).

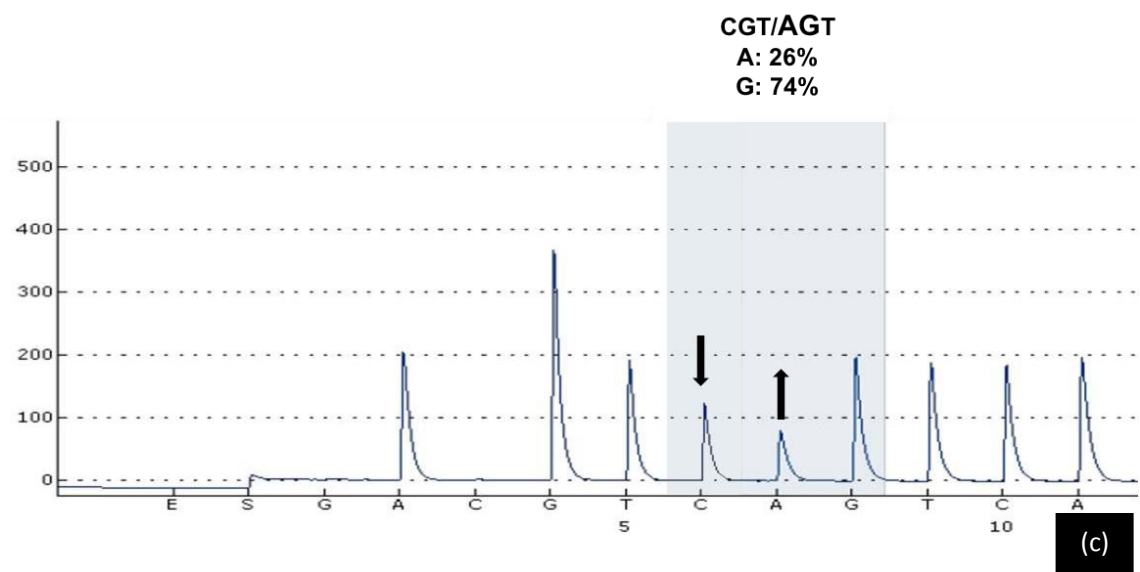
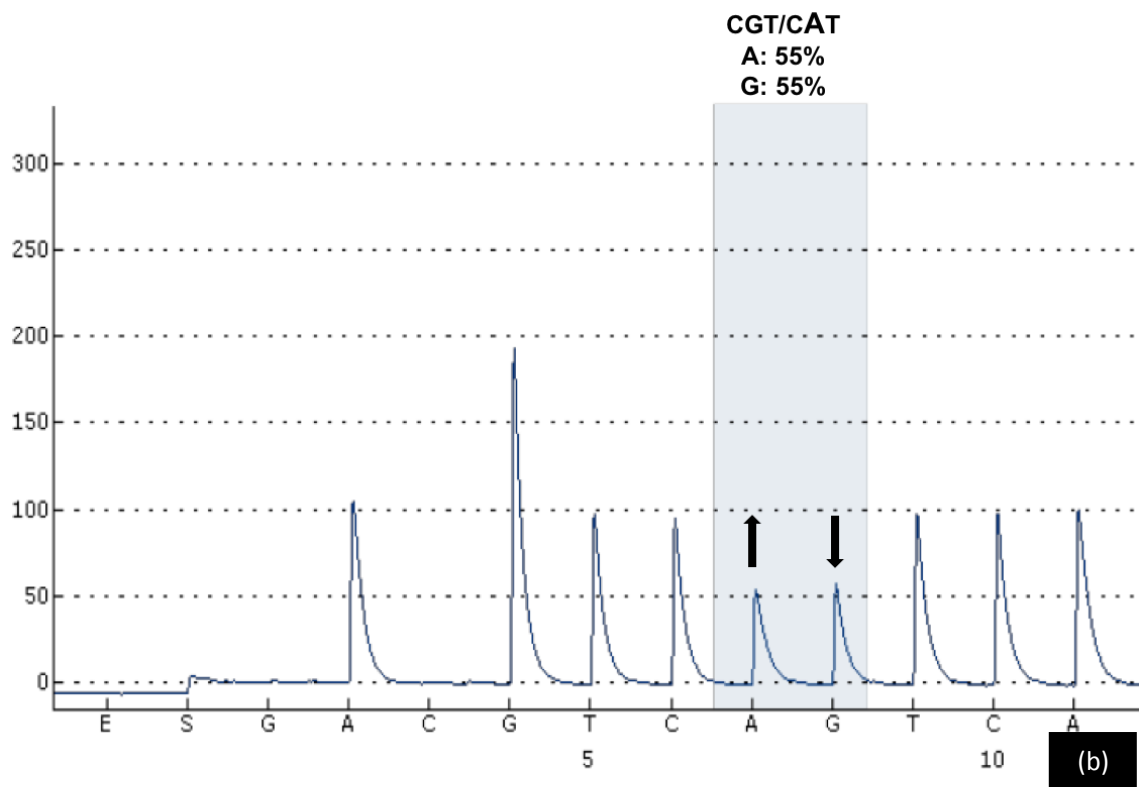
La mutación R132H se encontró en el 88% de los casos mutados, por pirosecuenciación se confirmaron las mutaciones detectadas por inmunohistoquímica y además, se

detectaron 4 mutaciones adicionales del gen (Tabla IV.6): R132S (6%), R132C (3%) y R132G (3%) (Figura IV.9).

ESTATUS IDH1	N	%	TIPO DE MUTACIÓN	N	%
IDH1 mutado	33	30,6	R132H	29	88
			R132S	2	6
			R132C	1	3
			R132G	1	3
IDH1 nativo	75	69,4			

Tabla IV.6. Frecuencia de mutaciones del gen de IDH1.





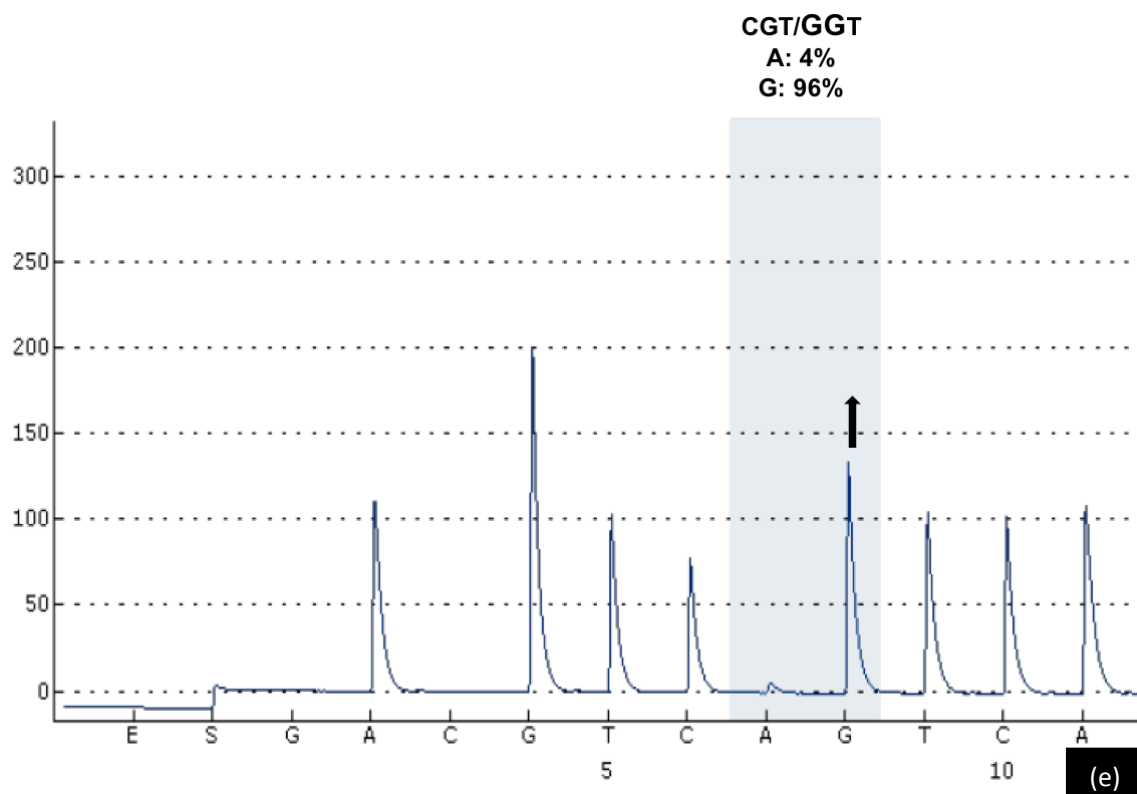
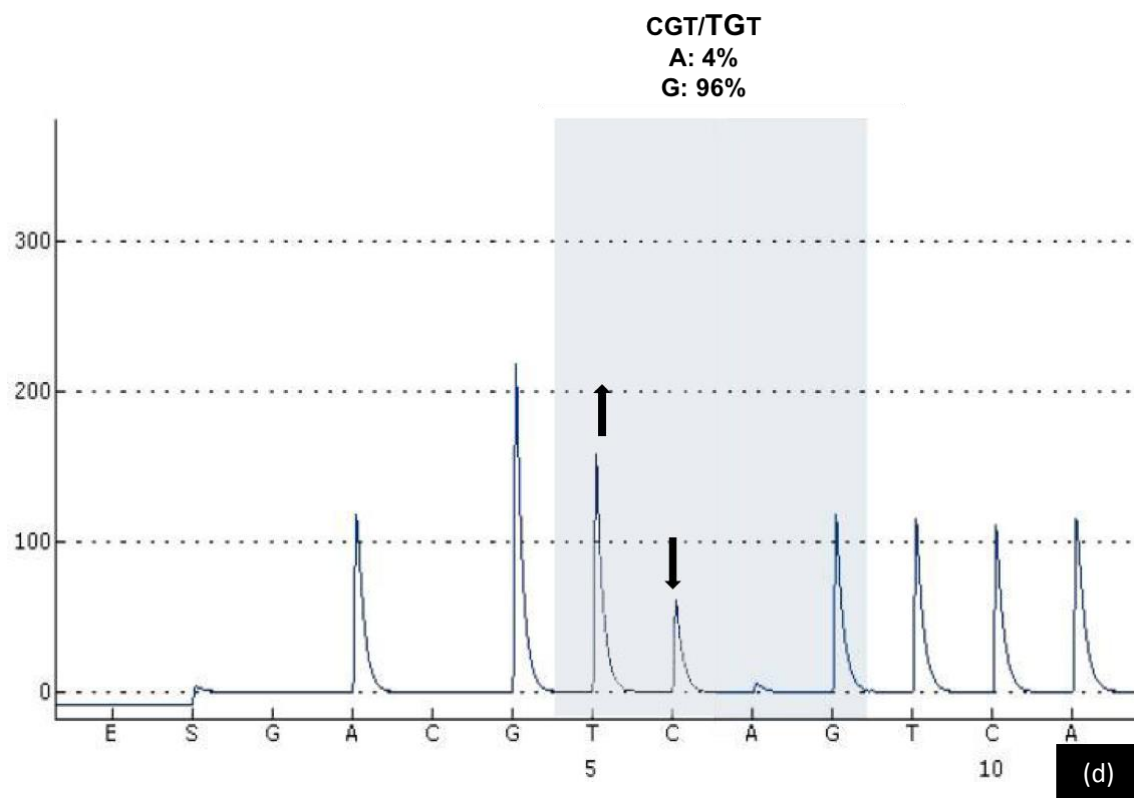


Figura IV.9. Determinación de la mutación de IDH1 mediante pirosecuenciación. Pirogramas: IDH1 nativo/CGT (a), IDH1 mutado/CAT (b), AGT (c), TGT (d), GGT (e).

Esta mutación se presentó en el 89,5% de los oligodendrogliomas, en el 61,9% de los astrocitomas y en el 4,4% de los glioblastomas, con unas diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$) (Tabla IV.7). Además, se asoció de manera significativa a los tumores de bajo grado histológico, el 87,5% de los gliomas grado II presentaron la mutación frente al 56,3% de los gliomas grado III y el 4,4% de los gliomas grado IV ($p<0,001$) (Tabla IV.8).

En 2 de los 3 glioblastomas con mutación de IDH1 se confirmó mediante la revisión de la historia clínica un antecedente de tumor astrocitario operado en otro centro por lo que se trataban de glioblastomas secundarios.

		ESTATUS GEN IDH1				
		IDH1 mutado (n=33)		IDH1 nativo (n=75)		
		N	%	N	%	p
Tipo histológico	Astrocitoma	13	61,9	8	38,1	P<0,001
	Oligodendroglioma	17	89,5	2	10,5	
	Glioblastoma	3	4,4	65	95,6	

Tabla IV.7. Mutación del gen de IDH1 en función del tipo histológico.

		ESTATUS GEN IDH1				
		IDH1 mutado (n=33)		IDH1 nativo (n=75)		
		N	%	N	%	p
Grado histológico	II	21	87,5	3	12,5	P<0,001
	III	9	56,3	7	43,8	
	IV	3	4,4	65	95,6	

Tabla IV.8. Mutación del gen de IDH1 en función del tipo histológico.

La mediana de edad de los pacientes en los que se detectó la mutación del gen de IDH1 fue de 38 años, para los pacientes con IDH1 nativo la mediana de edad fue de 57 años. Las diferencias en el estado del gen de IDH1 en función de la edad fueron significativas ($p<0,001$), en los pacientes menores de 50 años se detectó mutación de IDH1 en el 56,3% de los casos frente a un 10% en los pacientes mayores de 50 años

(Tabla IV.9). Además los 3 pacientes con glioblastomas con mutación de IDH1 eran menores de 50 años (35; 38 y 48 años).

		ESTATUS GEN IDH1				
		IDH1 mutado (n=33)		IDH1 nativo (n=75)		
		N	%	N	%	p
EDAD	<50 años	27	56,3	21	43,8	P<0,001
	≥50 años	6	10	54	90	

Tabla IV.9. Mutación del gen de IDH1 en función de la edad.

La localización más frecuente de los tumores con mutación de IDH1 fue en lóbulo frontal (66.7%) seguido del lóbulo parietal (33,3%), mientras que ningún caso con mutación del gen se presentó a nivel profundo, las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,002$) (Tabla IV.10).

		ESTATUS GEN IDH1				
		IDH1 mutado (n=33)		IDH1 nativo (n=75)		
		N	%	N	%	p
Localización	Frontal	22	66,7	24	32,9	P=0,002
	Temporal	11	33,3	25	34,2	
	Parietal	0	0	16	21,9	
	Occipital	0	0	1	1,4	
	Estructuras profundas	0	0	7	9,6	

Tabla IV.10. Mutación del gen IDH1 en función de la localización.

En los pacientes que presentaron recidiva tumoral confirmada mediante biopsia, se ha visto que el estado del gen de IDH1 se mantiene estable a lo largo de la evolución del tumor.

4.2. CODELECCIÓN 1P19Q.

El 16,7% de los casos mostraron codelección de 1p19q determinada por FISH (Figura IV.10).

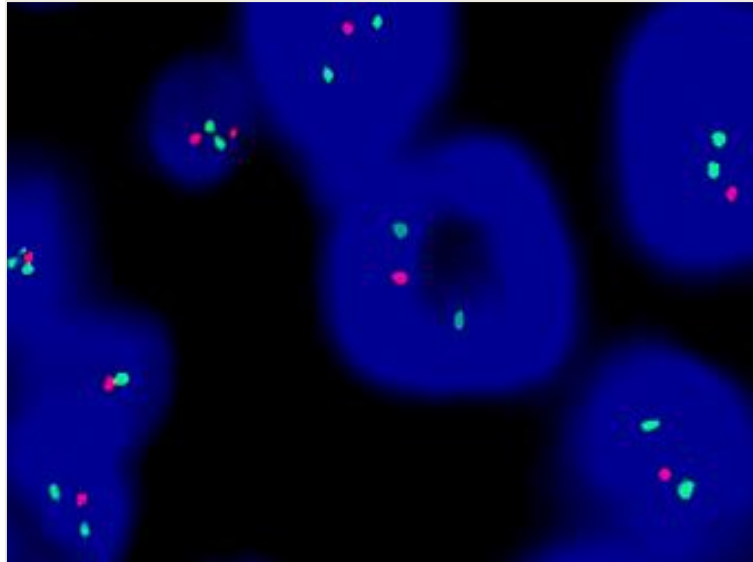


Figura IV.10. FISH para el estudio del cromosoma 1p (1p36/1q25) en un oligodendroglioma con deleción 1p19q (las señales obtenidas con la sonda 19p13/19q13 para el cromosoma 19 fueron similares). Las células muestran una señal roja (1p36) y 2 señales verdes (1q25) indicando pérdida del brazo corto del cromosoma 1. Contratinción DAPI. Imagen a 1000x.

Esta alteración se asoció significativamente a los oligodendrogliomas presentándose en el 100% de los casos. No se evidenció codelección en los tumores astrocitarios ni en los glioblastomas (Tabla IV.11). Además, fue más frecuente en los gliomas de grado histológico II (77,85%, n=14) en comparación los gliomas grado III (22,2% n=4), las diferencias fueron estadísticamente significativas (Tabla IV.12).

		CODELECIÓN 1p19q				
		Codelección (n=18)		No codelección (n=85)		
		N	%	N	%	p
Tipo histológico	Astrocitoma	0	0	19	22,4	P<0,001
	Oligodendroglioma	18	100	0	0	
	Glioblastoma	0	0	66	77,6	

Tabla IV.11. Codelección 1p19q en función del tipo histológico.

		CODELECIÓN 1p19q				
		Codelección (n=18)		No codelección (n=85)		
		N	%	N	%	p
Grado histológico	II	14	77,8	8	9,4	P<0,001
	III	4	22,2	11	12,9	
	IV	0	0	66	77,6	

Tabla IV.12. Codelección 1p19q en función del grado histológico.

La edad de los pacientes con codelección 1p19q fue significativamente menor que la de los pacientes sin codelección ($p<0,001$), la mediana de edad fue de 35 años frente a 55 años respectivamente. Además, esta alteración se presentó en el 83,3% de los pacientes menores de 50 años (15/18 casos), mientras que solo se evidenció en el 16,7% de los pacientes mayores de 50 años (Tabla IV.13).

		CODELECCIÓN 1p19q				
		Codelección (n=18)		No codelección (n=85)		
		N	%	N	%	p
EDAD	<50 años	15	83,3	30	35,5	P<0,001
	≥50 años	3	16,7	55	64,7	

Tabla IV.13. Codelección 1p19q en función de la edad.

Los tumores con codelección 1p19q se localizaron en los lóbulos frontal y temporal y no afectaron estructuras profundas, las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,006$) (Tabla IV.14).

		CODELECCIÓN 1p19q				p
		Codelección (n=18)		No codelección (n=85)		
		N	%	N	%	
Localización	Frontal	15	83,3	30	35,3	P=0,006
	Temporal	3	16,7	32	37,6	
	Parietal	0	0	16	18,8	
	Occipital	0	0	1	1,2	
	Estructuras profundas	0	0	6	7,1	

Tabla IV.14. Codelección 1p19q en función de la localización.

La codelección 1p y 19q se mantuvo estable en las biopsias de recidiva tumoral.

4.3. EXPRESIÓN DE P53.

Se observó sobreexpresión de p53 en 29 casos (26,9%) frente a 79 casos considerados negativos (73,1%) (Figura IV.11).

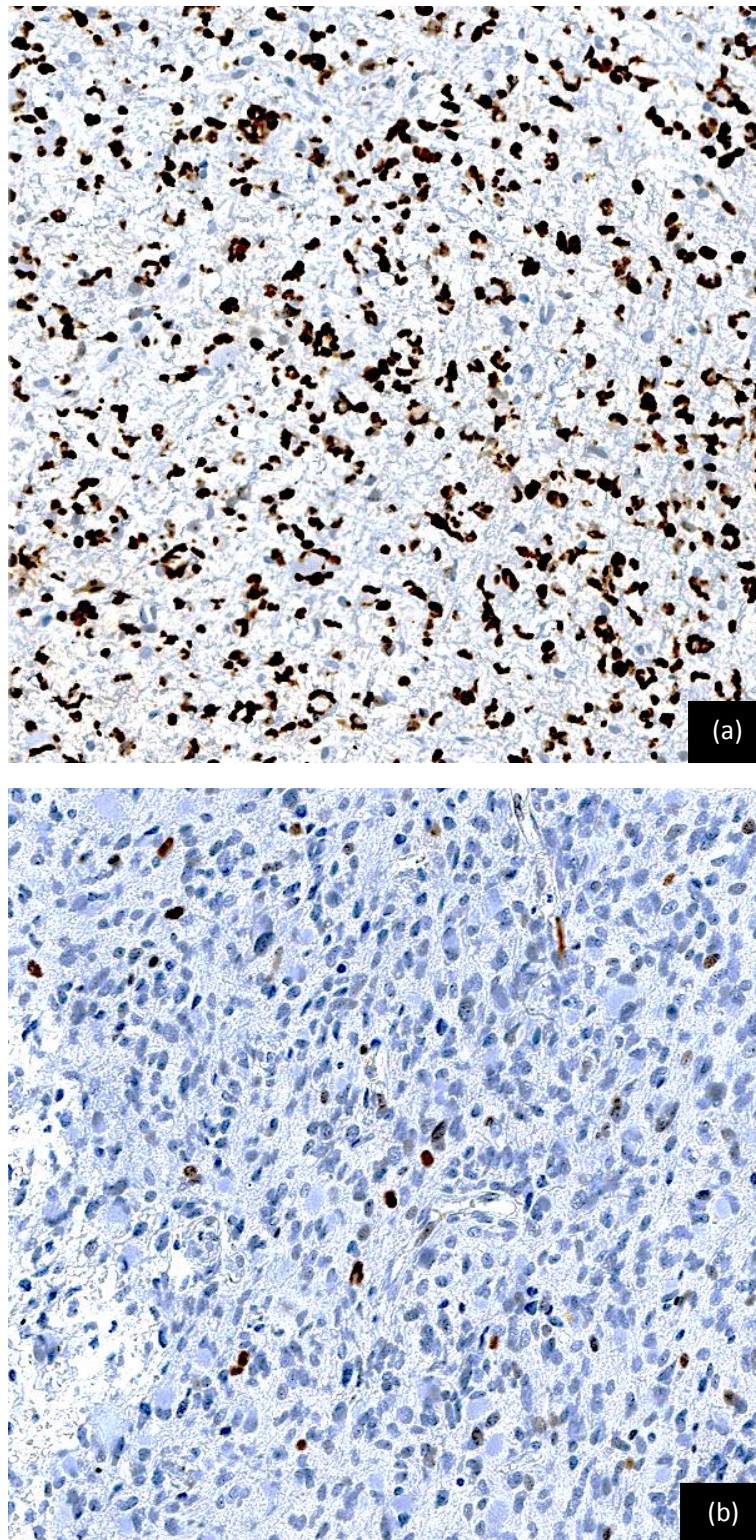


Figura IV.11. Técnica de inmunohistoquímica para p53. Tinción nuclear intensa en >50% de las células tumorales, patrón de tinción positivo (a), tinción débil en <50% de las células tumorales, patrón de tinción negativo.

El 44,4% de los astrocitomas grado II presentaron esta alteración, el 66,7% de los astrocitomas grado III y el 25% de los glioblastomas, no se identificó sobreexpresión de

p53 en los oligodendrogliomas (Tabla IV.15). Las diferencias en función del tipo histológico fueron estadísticamente significativas ($p<0,001$), sin embargo esta alteración no se asoció al grado histológico (Tabla IV.16).

		P53				
		P53 positivo (n=29)		P53 negativo (n=79)		
		N	%	N	%	p
Tipo histológico	Astrocitoma	12	57,1	9	42,9	P<0,001
	Oligodendroglioma	0	0	19	100	
	Glioblastoma	17	25	51	75	

Tabla IV.15. P53 en función del tipo histológico.

		P53				
		P53 positivo (n=29)		P53 negativo (n=79)		
		N	%	N	%	p
Grado histológico	II	4	13,8	20	25,3	P=0,056
	III	8	27,6	8	10,1	
	IV	17	58,6	51	64,6	

Tabla IV.16. P53 en función del grado histológico.

El 51,7% de los pacientes con sobreexpresión de p53 (15/29 casos) fueron menores de 50 años (<50 años) mientras que el 48,3% (14/29 casos) fueron mayores de 50 años (≥ 50 años). Las diferencias en la sobreexpresión de p53 en función de la edad no fueron significativas (Tabla IV.17).

		P53				p
		P53 positivo (n=29)		P53 negativo (n=79)		
		N	%	N	%	
EDAD	<50 años	15	51,7	33	41,8	P=0,24
	≥50 años	14	48,3	46	58,2	

Tabla IV.17. P53 en función de la edad.

4.4. EXPRESIÓN DE ATRX.

La mutación de ATRX se determinó mediante inmunohistoquímica, observando una pérdida de expresión homogénea de la proteína en las células tumorales. Esta pérdida se observó en 19 casos (17,6%) frente a 86 casos (76,6%) en los cuales se conservó la expresión de la proteína (Figura IV.12).

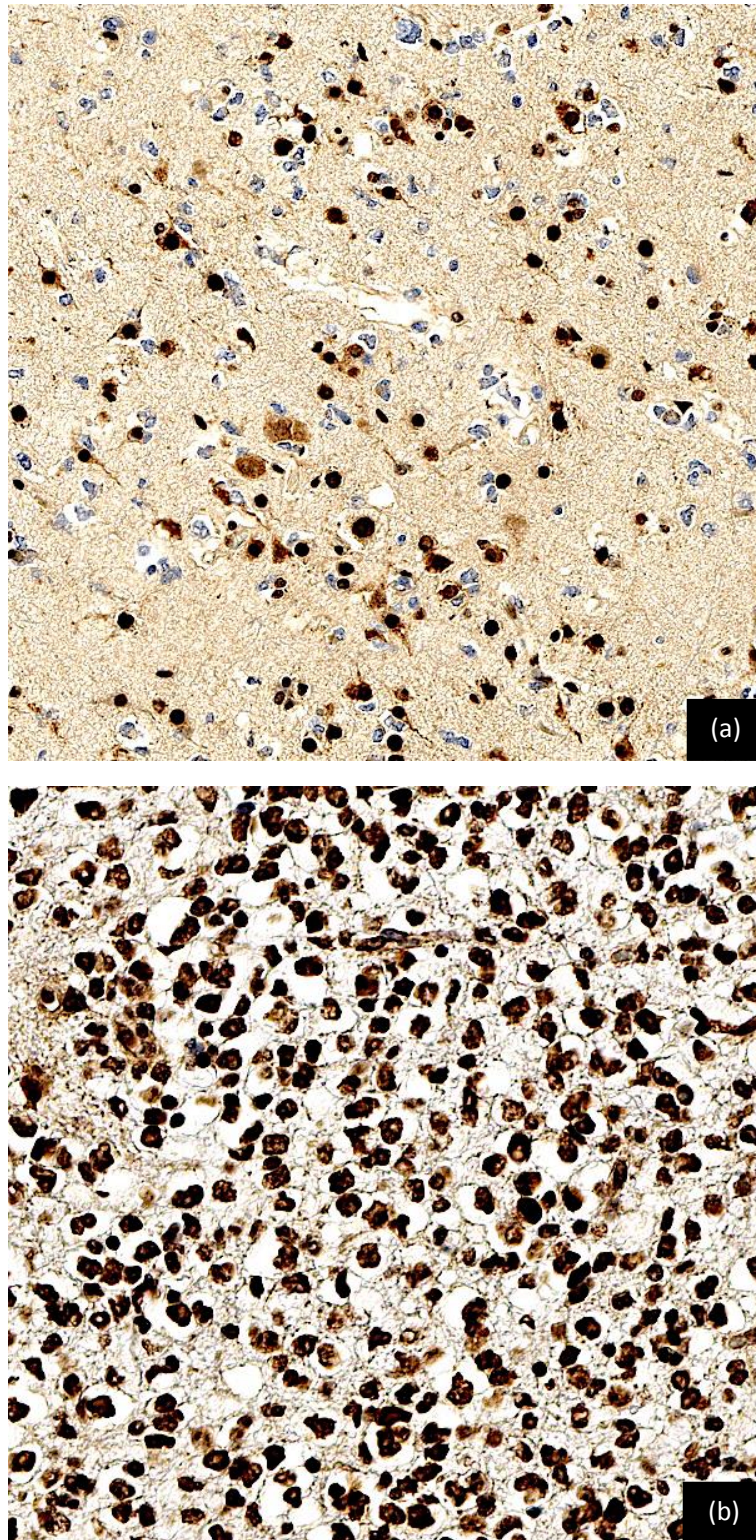


Figura IV.12. Técnica de inmunohistoquímica para el estudio de la expresión de ATRX. Astrocitoma difuso con mutación de ATRX, se aprecia una pérdida de expresión difusa de la proteína en las células tumorales y una conservación de la tinción nuclear en las células no neoplásicas (a), oligodendroglioma con ATRX conservado, tinción difusa nuclear de la proteína en las células tumorales (b).

Esta pérdida de expresión se detectó en el 100% de los AD, en el 58,3% de los AA y en el 4,6% de los GBM (Tabla IV.18). No se objetivó pérdida de ATRX en los tumores oligodendrogiales (Tabla IV.19). Las diferencias en la expresión de la proteína con respecto al diagnóstico histológico fueron estadísticamente significativas.

		EXPRESIÓN ATRX				
		Pérdida de expresión (n=19)		Expresión (n=86)		
		N	%	N	%	p
Grado histológico	II	9	37,5	15	62,5	P<0,001
	III	7	43,8	9	56,3	
	IV	3	4,6	62	95,6	

Tabla IV.18. Expresión de ATRX en función del grado histológico.

		EXPRESIÓN ATRX				
		Pérdida de expresión (n=19)		Expresión (n=86)		
		N	%	N	%	p
Tipo histológico	Astrocitoma	16	84,2	5	5,8	P<0,001
	Oligodendroglioma	0	0	19	100	
	Glioblastoma	3	4,6	62	95,4	

Tabla IV.19. Expresión de ATRX en función del tipo histológico.

La mayoría de los pacientes con pérdida de expresión de ATRX (84,2%, n=16) fueron pacientes jóvenes, solo un 15,8% (3/19 casos) fueron mayores de 50 años. Las diferencias en la expresión de ATRX en función de la edad fueron significativas (p<0,001) (Tabla IV.20).

		EXPRESIÓN DE ATRX				
		Pérdida de expresión (n=19)		Expresión (n=86)		
		N	%	N	%	p
EDAD	<50 años	16	84,2	30	34,9	P<0,001
	≥50 años	3	15,8	56	65,1	

Tabla IV.20. Expresión de ATRX en función de la edad.

En las biopsias correspondientes a las cirugías de recidiva, no se evidenció un cambio en la expresión de ATRX en relación al tumor primario.

4.5. AMPLIFICACIÓN DE EGFR Y PRESENCIA DE EGFRvIII.

El estudio del estado del gen de EGFR mediante FISH reveló amplificación del gen en 22 casos (20,4%), mostrando un patrón de amplificación homogéneo y un número medio de copias de 30. En 83 casos (76,9%) no se detectó amplificación (Figura IV.13).

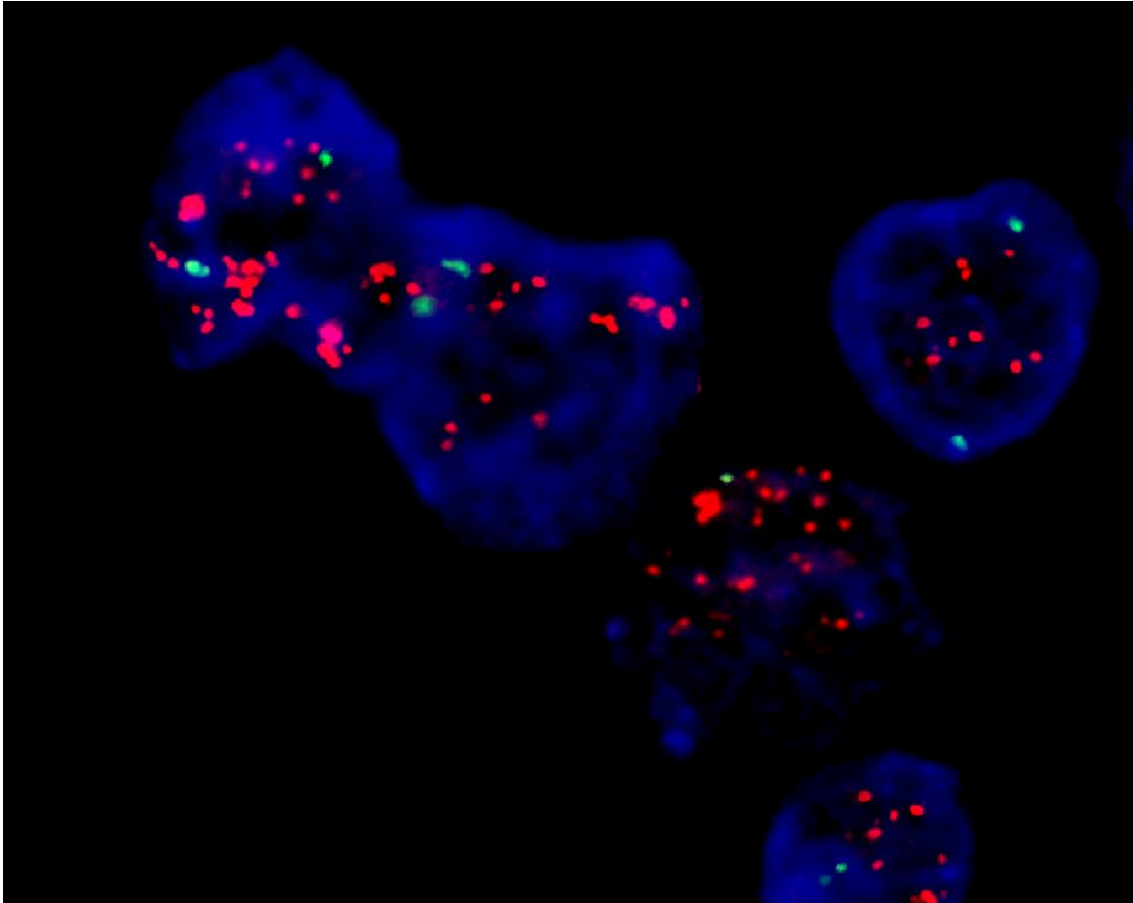


Figura IV.13. FISH para el estudio de EGFR (EGFR/CEP7) en un glioblastoma. Las células muestran una media de 20 señales rojas (EGFR) y 2 señales verdes (CEP7) indicando amplificación de EGFR. Contratinción DAPI. Imagen a 1000x.

Esta alteración genética se presentó únicamente en los pacientes con glioblastoma (33,3% de los glioblastomas) con unas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Tabla IV.21).

		ESTATUS DE EGFR				P
		Amplificación (n=22)		No amplificación (n=83)		
		N	%	N	%	
Tipo histológico	AD y AA	0	0	0	0	P<0,001
	O y OA	0	0	0	0	
	GBM	22	33,3	44	66,7	

Tabla IV.21. Amplificación del gen de EGFR en función del grado y tipo histológico.

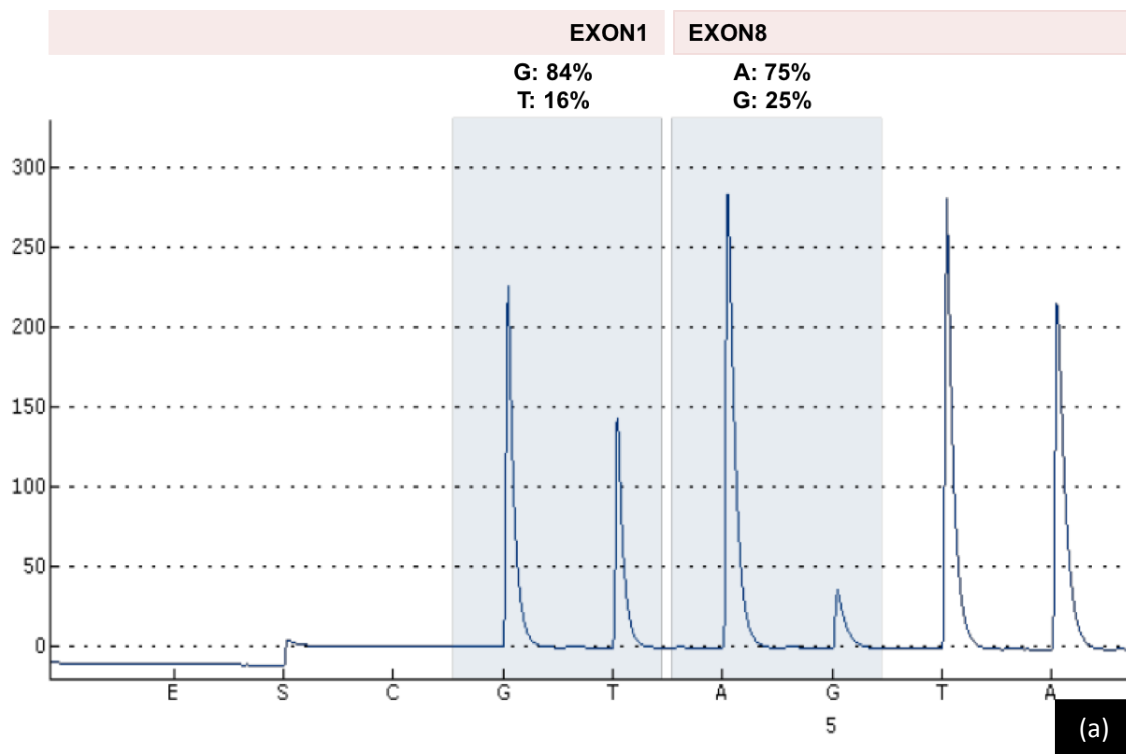
Esta alteración se detectó con mayor frecuencia en el grupo de pacientes mayores de 50 años presentándose en un 81,8% de los casos frente al 18,2% de los pacientes menores de 50 años. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,004$) (Tabla IV.22).

		ESTATUS DE EFGR				
		Amplificación (n=22)		No amplificación (n=83)		
		N	%	N	%	p
EDAD	<50 años	4	18,2	43	51,8	P=0,004
	≥50 años	18	81,8	40	48,2	

Tabla IV.22. Amplificación del gen de EGFR en función de la edad.

En todos los casos con recidiva se mantuvo estable el estado del gen del EGFR. La detección de EGFRvIII se analizó únicamente en los glioblastomas detectándose en 18 casos (26,5%) (Figura IV.14).

iiii



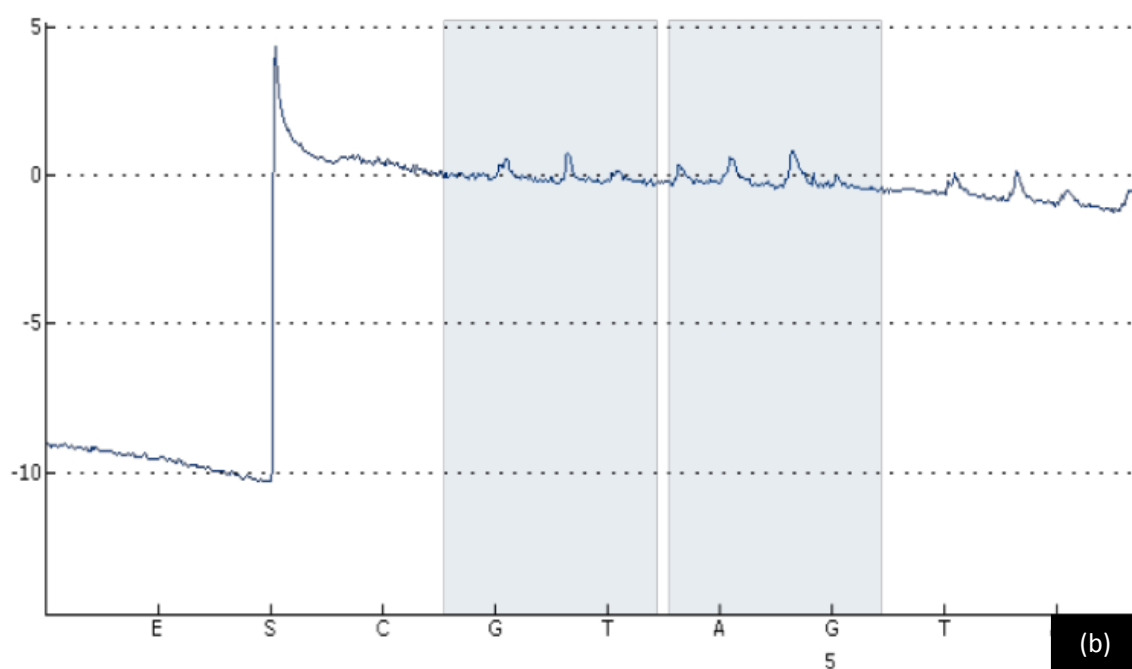


Figura IV.14. Determinación de la presencia de EGFRvIII mediante pirosecuenciación. Pirogramas con presencia de EGFRvIII (a), ausencia de EGFRvIII (b).

El 55,5% de los casos con presencia de EGFRvIII mostraron además amplificación del gen de EGFR, la asociación entre ambas alteraciones de EGFR fue significativa (Tabla IV.23).

		ESTATUS DE EFGR				
		Amplificación (n=22)		No amplificación (n=83)		
		N	%	N	%	p
EGFRvIII	Presencia	10	54,5	7	16,7	P=0,004
	Ausencia	12	45,5	35	83,3	

Tabla IV.23. Asociación entre la amplificación de EGFR y presencia de EGFRvIII.

4.6. METILACIÓN DE MGMT.

La metilación del promotor del gen del MGMT se objetivó en 55 casos (50,9%) frente a 53 casos (49,1%) sin metilación del gen (Figura IV.15).

La mediana del porcentaje de metilación de MGMT fue del 12% en los casos metilados y del 2% en los casos no metilados.

La mediana del porcentaje de metilación de las islas CpG analizadas fue de: 6% (isla 1), 8% (isla 2), 6% (isla 3) y 13% (isla 4).

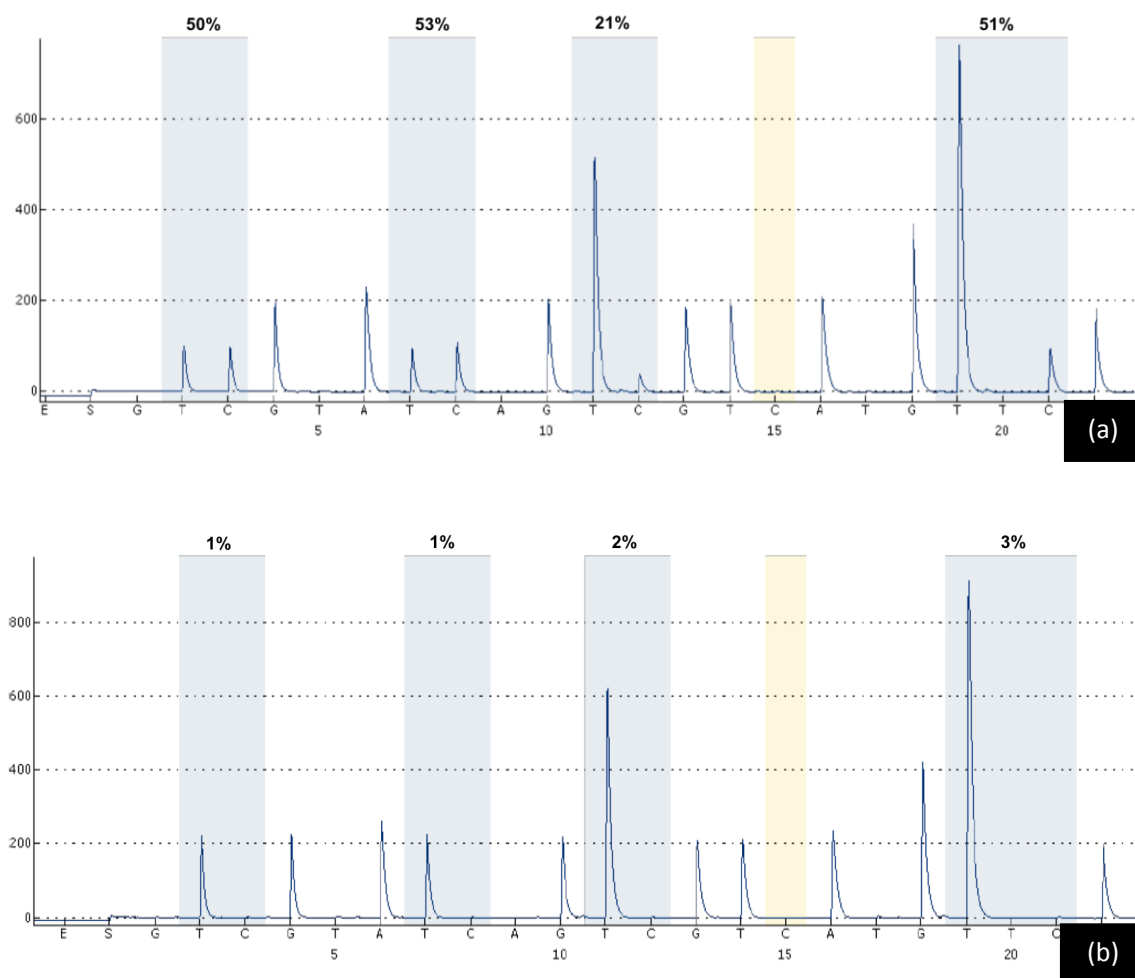


Figura IV.15. Determinación de la metilación de MGMT mediante pirosecuenciación. Pirogramas MGMT metilado (a), MGMT no metilado (b).

Esta alteración se presentó en el 44,4% de los AD, en el 58,3% de los AA, en el 44,1% de los GBM, en el 66,7% de los oligodendrogliomas y en el 100% de los OA. Las diferencias en función del tipo (Tabla IV.24) y grado histológico (Tabla IV.25) no fueron significativas.

		METILACIÓN DE MGMT				
		Metilación (n=55)		No metilación (n=53)		
		N	%	N	%	P
Tipo histológico	Astrocitoma	11	20	10	18,9	P=0,119
	Oligodendroglioma	14	25,5	5	9,4	
	Glioblastoma	30	54,5	38	71,7	

Tabla IV.24. Metilación de MGMT en función del tipo histológico.

		METILACIÓN DE MGMT				
		Metilación (n=55)		No metilación (n=53)		
		N	%	N	%	P
Grado histológico	II	14	25,5	10	18,9	P=0,148
	III	11	20	5	9,4	
	IV	30	54,5	38	71,7	

Tabla IV.25. Metilación de MGMT en función del grado histológico.

El 47,3% de los pacientes con metilación de MGMT (26/55 casos) fueron menores de 50 años (<50 años) y el 52,7% (29/55 casos) fueron mayores de 50 años (≥ 50 años). Las diferencias en el estado de metilación del promotor del gen de MGMT en función de la edad no fueron significativas (Tabla IV.26).

METILACIÓN DE MGMT					
		Metilación (n=55)		No metilación (n=53)	
		N	%	N	%
EDAD	<50 años	26	47,3	22	41,5
	≥50 años	29	52,7	31	58,5
					P=0,341

Tabla IV.26. Metilación de MGMT en función de la edad.

En los casos con recidiva (28 casos), se objetivó un cambio en el estado de metilación en el 27,3% (3/11 casos) de los casos metilados y en el 58,8% de los casos no metilados (10/17 casos) (Tabla IV.27).

		Tumor PRIMARIO metilado (n=11)		Tumor PRIMARIO no metilado (n=17)	
		N	%	N	%
Estado metilación	Metilado	8	72,7	10	58,8
	No metilado	3	27,3	7	41,2

Tabla IV.27. Estado de metilación de MGMT en la recidiva tumoral.

4.7. RESUMEN DE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

La siguiente tabla muestra un resumen todas las alteraciones moleculares en función del diagnóstico histológico (Tabla IV.28).

DIAGNÓSTICO	MUTACIÓN IDH1	CODELECCIÓN 1p19*	P53 POSITIVO	PÉRDIDA ATRX*	AMPLIFICACIÓN EGFR*	EGFRvIII*	METILACIÓN MGMT
AD (n=9)	8/9 (88,9%)	0	4/9 (44,4%)	9/9 (100%)	0	--	4/9 (44,4%)
AA (n=12)	5/12 (41,7%)	0	8/12 (66,7%)	7/12 (58,3%)	0	--	7/12 (58,3%)
GBM (n=68)	3/68 (4,4)	0	17/68 (25%)	3/68 (4,6%)	22/66 (33,3%)	18/65 (27,7%)	30/68 (44,1%)
O (n=15)	13/15 (86,7%)	14/14 (100%)	0	0	0	--	10/15 (66,7%)
OA (n=4)	4/4 (100%)	4/4 (100%)	0	0	0	--	4/4 (100%)

Tabla IV.28. Parámetros moleculares en función del diagnóstico histológico. (*) No se obtuvieron todos los resultados.

5. FACTORES PRONÓSTICOS.

5.1. PARÁMETROS CLÍNICOS.

Entre los parámetros clínicos analizados, la edad fue el factor pronóstico más importante. La supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG) fueron mayores en el grupo de pacientes jóvenes (< 50 años) en comparación con los pacientes ≥ 50 años (21 meses frente a 6 meses y 28 meses frente a 11 meses respectivamente) con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Figura IV.16).

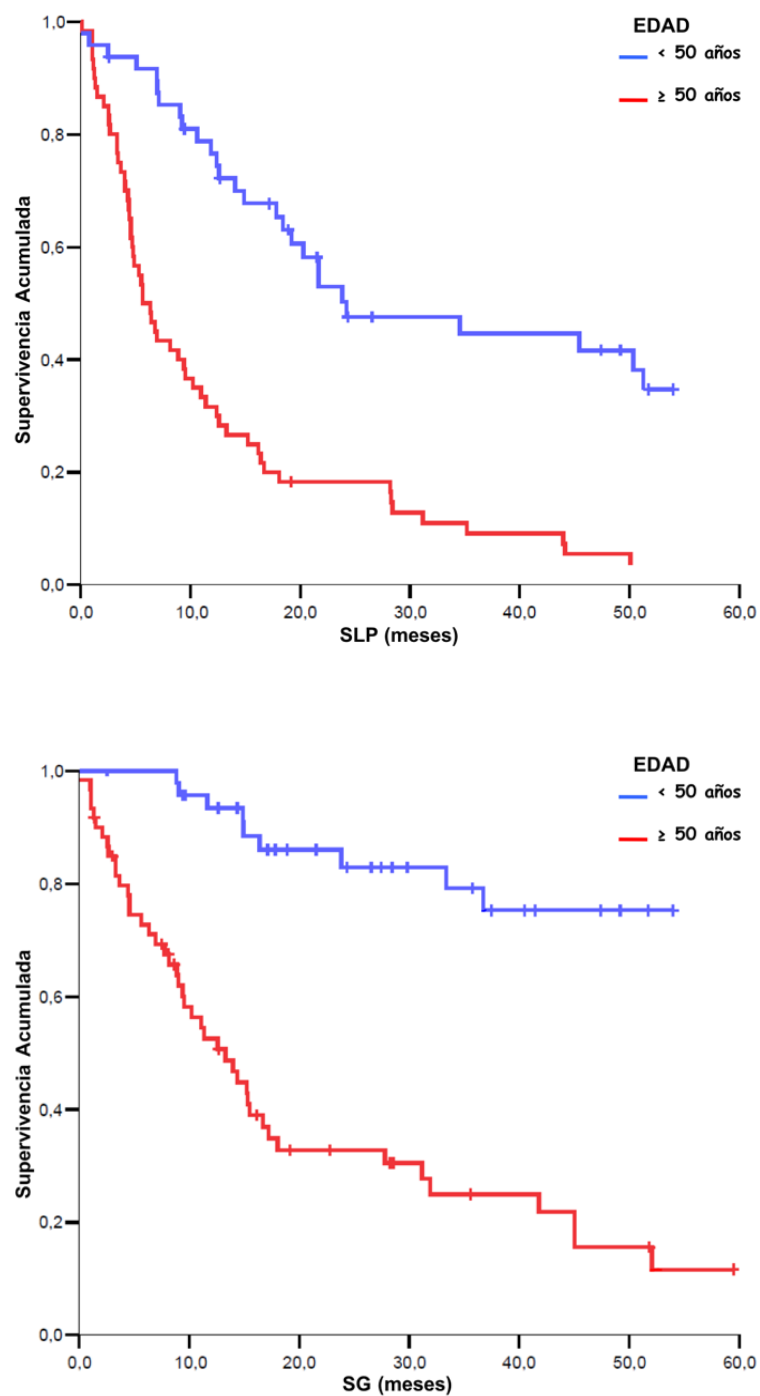


Figura IV.16. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la edad (punto de corte 50 años) ($p < 0,001$ para la SLP y la SG).

La localización supuso también un factor pronóstico asociado a SLP ($p = 0,005$) y SG ($p < 0,001$), los pacientes con gliomas hemisféricos presentaron mejor supervivencia que aquellos con gliomas profundos (Figura IV.17).

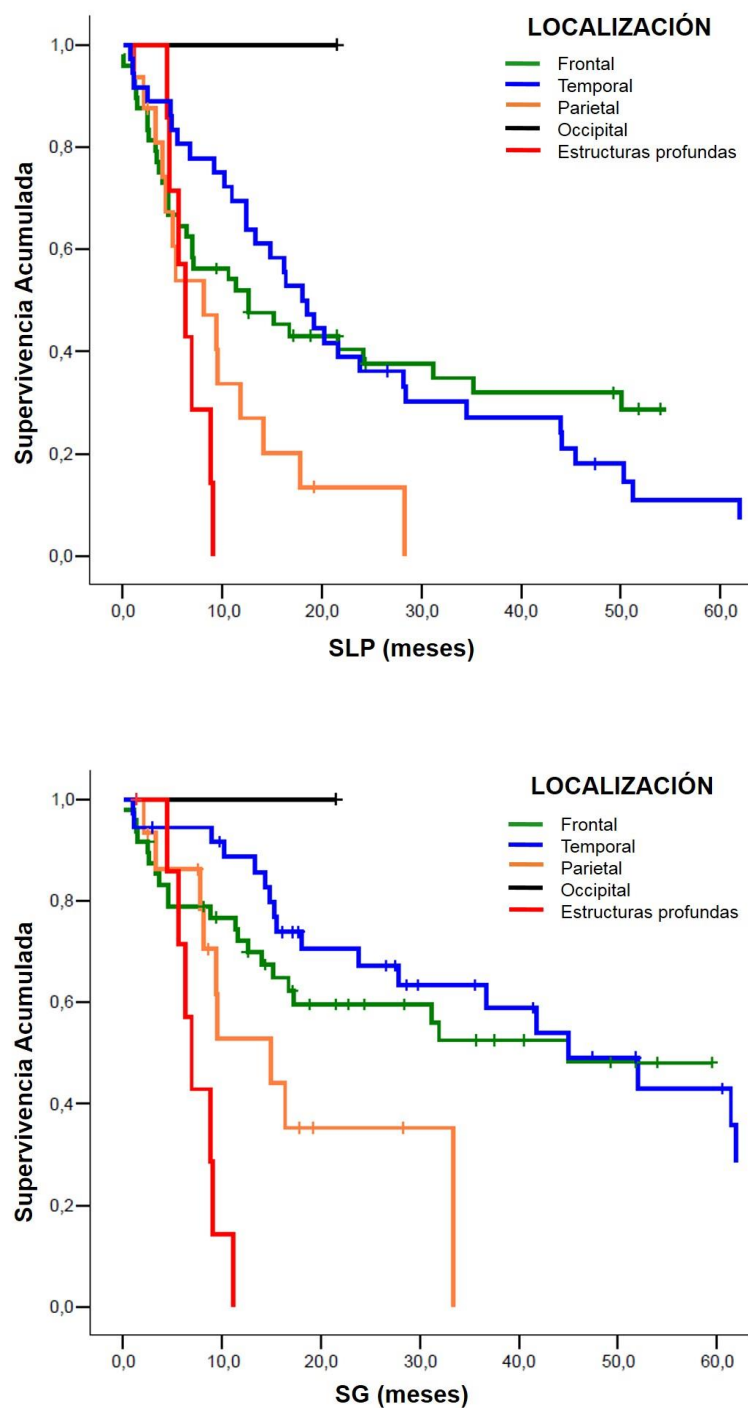


Figura IV.17. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la localización. SLP ($p=0,005$), SG ($p<0,001$).

Los pacientes sometidos a cirugía presentaron mayor SLP y SG que aquellos en los que se realizó únicamente biopsia estereotáctica ($p<0,001$) (Figura IV.18).

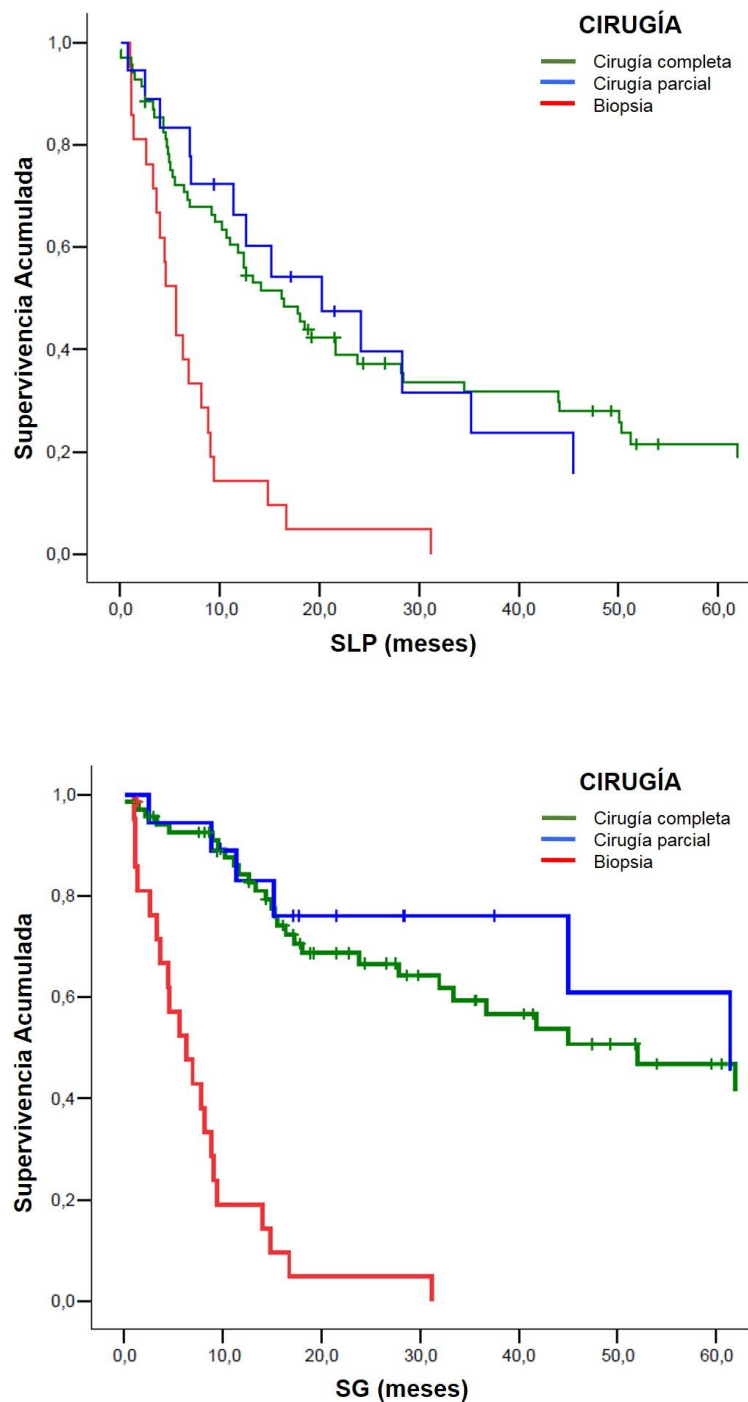


Figura IV.18. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función del tipo de cirugía ($p < 0,001$ para la SLP y la SG).

Por último, no se evidenciaron diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes asociadas al tratamiento adyuvante a la cirugía (Figura IV.19).

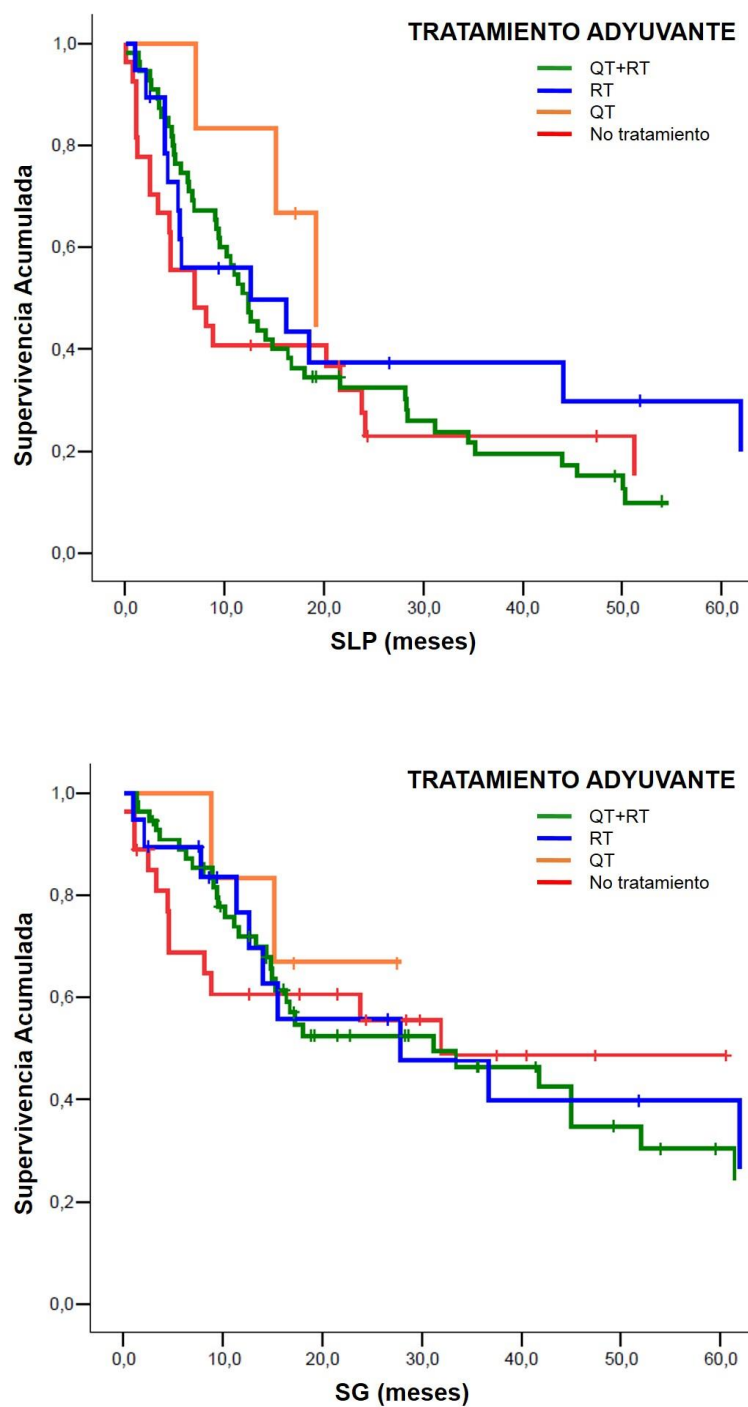


Figura IV.19. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función del tratamiento adyuvante. SLP ($p=0,267$), SG ($p=0,748$).

5.2. PARÁMETROS HISTOLÓGICOS.

En nuestra serie, el diagnóstico histológico representó un factor pronóstico de supervivencia con diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$) (Figuras IV.20-21).

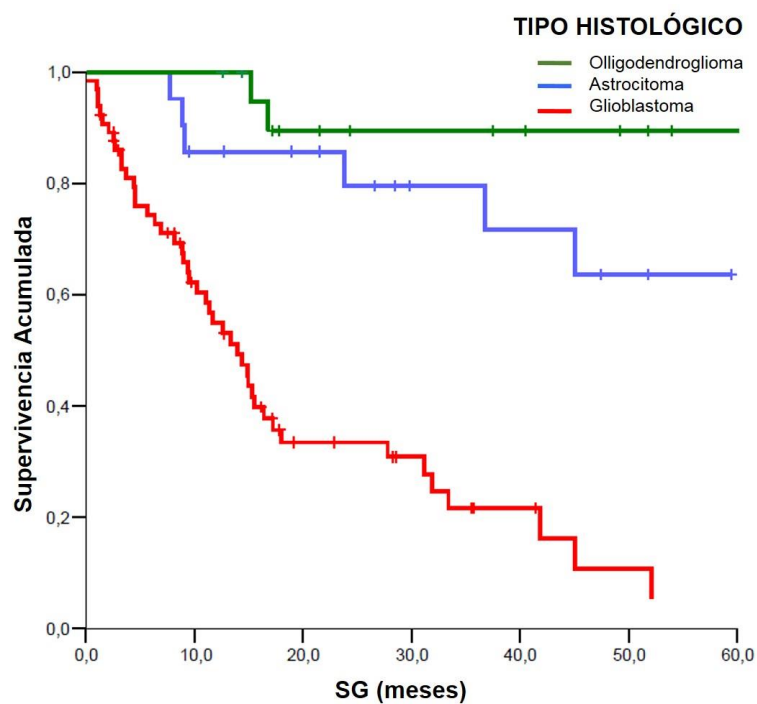
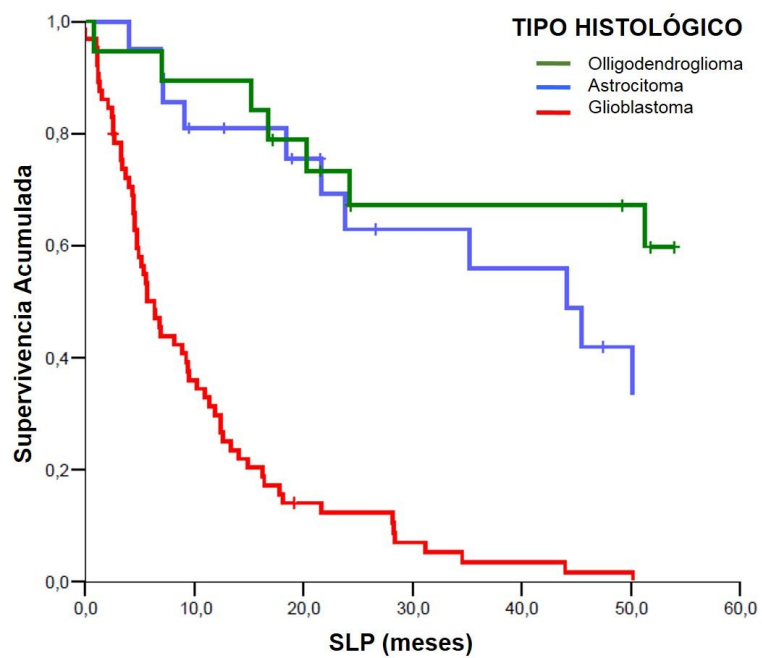


Figura IV.20. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función del tipo histológico ($p < 0,001$ para la SLP y la SG).

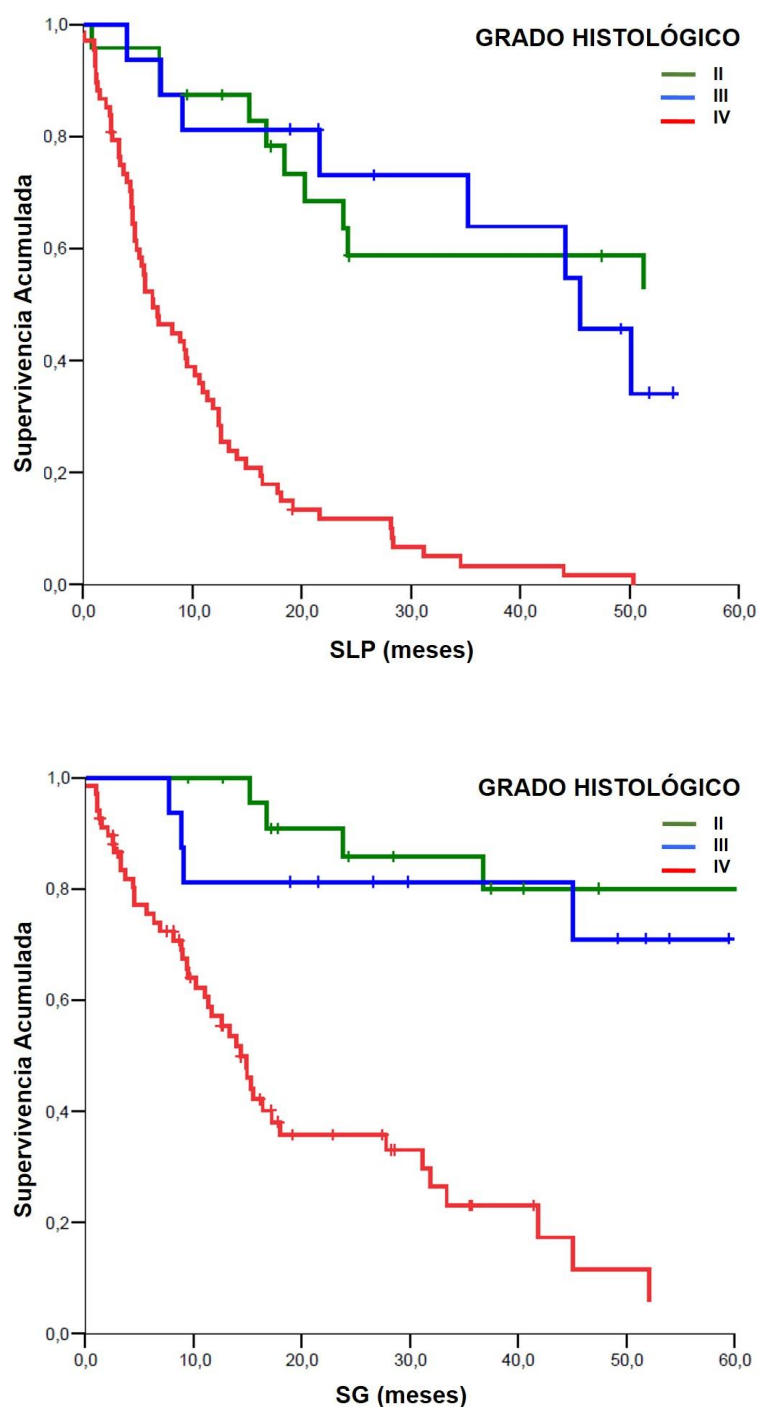


Figura IV.21. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función del grado histológico ($p < 0,001$ para la SLP y la SG).

Las medianas de supervivencia fueron de 37 meses para los AD, 28 meses para los AA, 11 meses para los GBM, 61 meses para los oligodendrogliomas y 50 meses para los OA. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0,001$) (Tabla IV.29).

	Mediana SG	Media SG	IC [5-95%]
AD	37	64	2-72
AA	28	34	15-41
GBM	11	15	8-15
O	61	70	36-85
OA	50	44	36-65

Tabla IV.29. Supervivencia global en función del diagnóstico histológico.

5.3. ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN.

Estableciendo un punto de corte del 10% [64], los pacientes con índice de proliferación $Ki67 \geq 10\%$ presentaron menor SLP y SG que aquellos con índice de proliferación $<10\%$ (medianas de supervivencia de 14 meses frente a 44 meses respectivamente) las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$ para la SLP y la SG) (Figura IV.22).

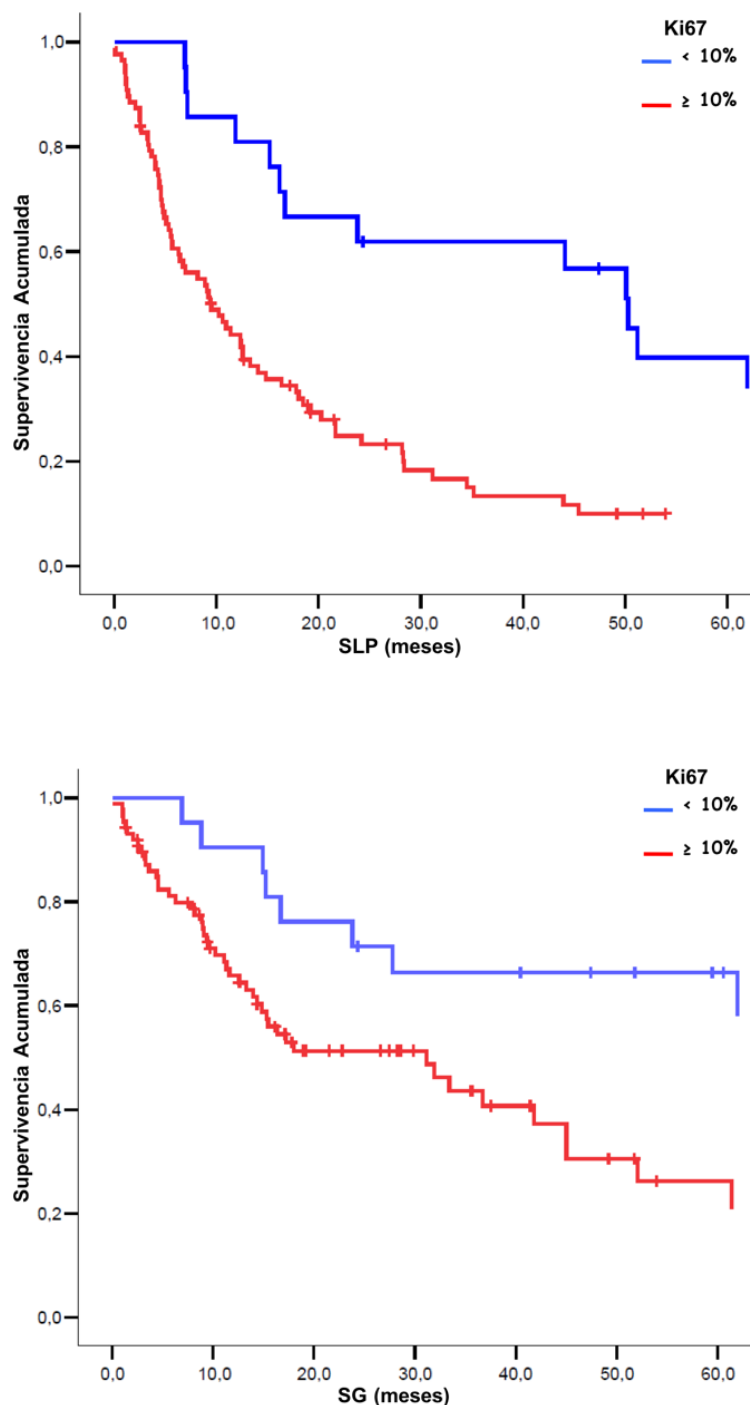


Figura IV.22. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función del índice de proliferación Ki67 (punto de corte 10%) ($p < 0,001$ para la SLP y SG).

5.4. PARÁMETROS MOLECULARES.

5.4.1. MUTACIÓN DEL GEN DE IDH1.

La mutación del gen de IDH1 se asoció a buen pronóstico, los pacientes que presentaron esta mutación mostraron mayor SLP y SG con unas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Figura IV.23). Las medianas de SLP fueron de 44 meses en los pacientes con la mutación del gen frente a 7 meses en los pacientes

con IDH1 nativo, y las medianas de SG de 49 meses frente a 12 meses respectivamente.

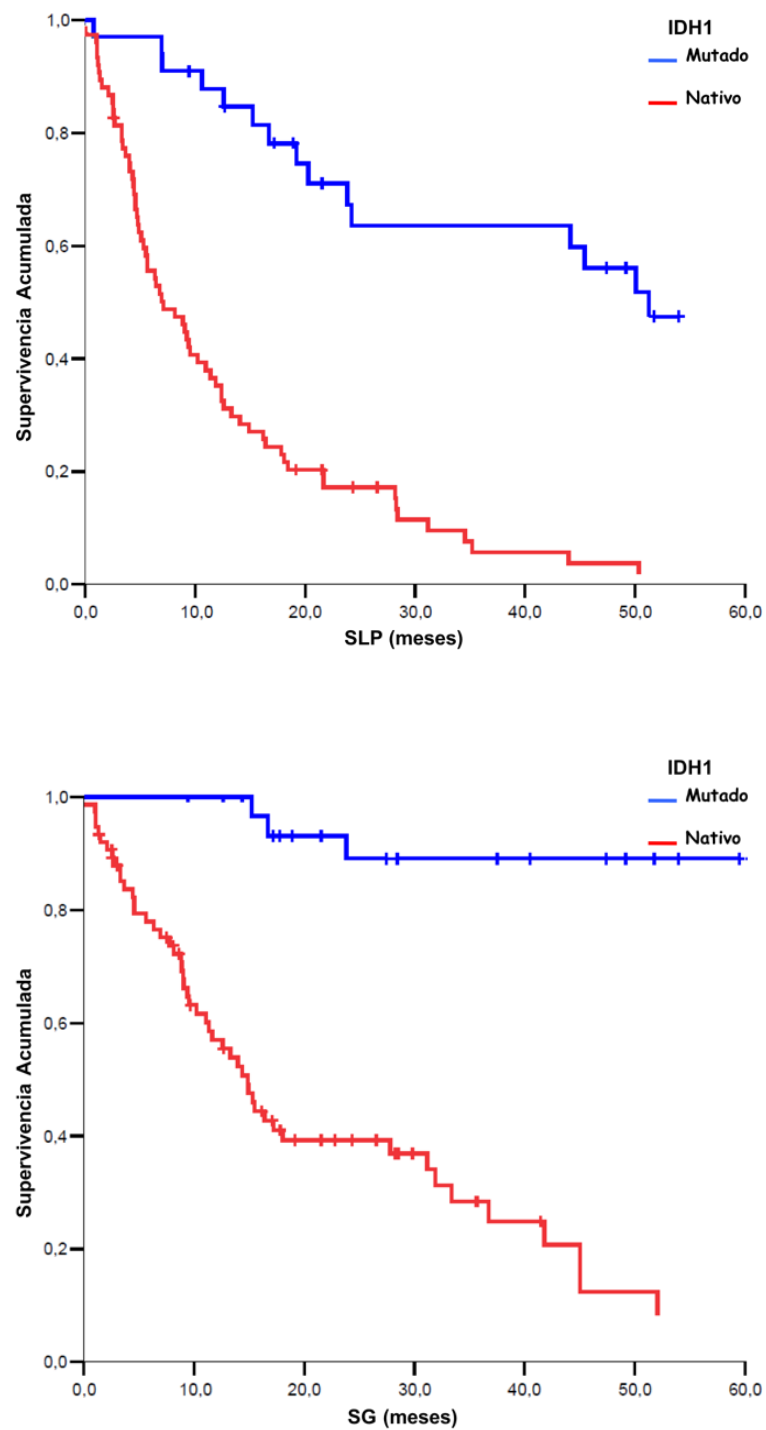


Figura IV.23. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la mutación de IDH1 ($p < 0,001$ para la SLP y la SG).

5.4.2. CODELECCIÓN 1p19q.

Los pacientes que presentaron la codeleción del 1p19q mostraron una mayor supervivencia libre de enfermedad (mediana de 44 meses) y una mayor supervivencia global (mediana de 49 meses) en comparación con los pacientes sin la pérdida cromosómica (medianas de 7 meses y 12 meses respectivamente), las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Figura IV.24).

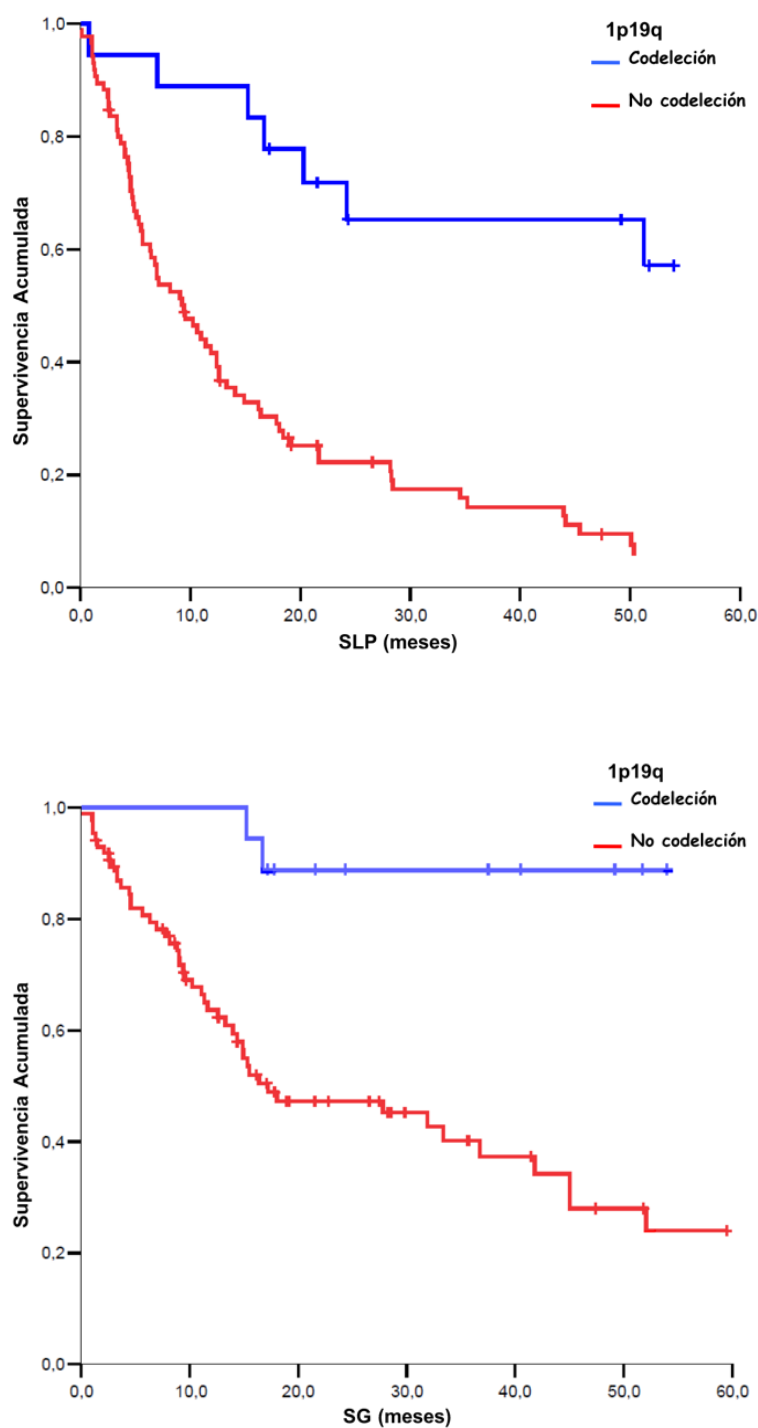


Figura IV.24. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la codeleción 1p19q ($p < 0,001$ para la SLP y la SG).

5.4.3. ESTUDIO DE P53.

El estudio de p53 mediante IHQ no supuso un factor determinante en la supervivencia de los pacientes con gliomas difusos, la mediana de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con p53 positivo fue de 14 meses frente a 9 meses en los pacientes con p53 negativo. La mediana de supervivencia global fue de 19 frente a 15 respectivamente. Las diferencias no fueron significativas (Figura IV.25).

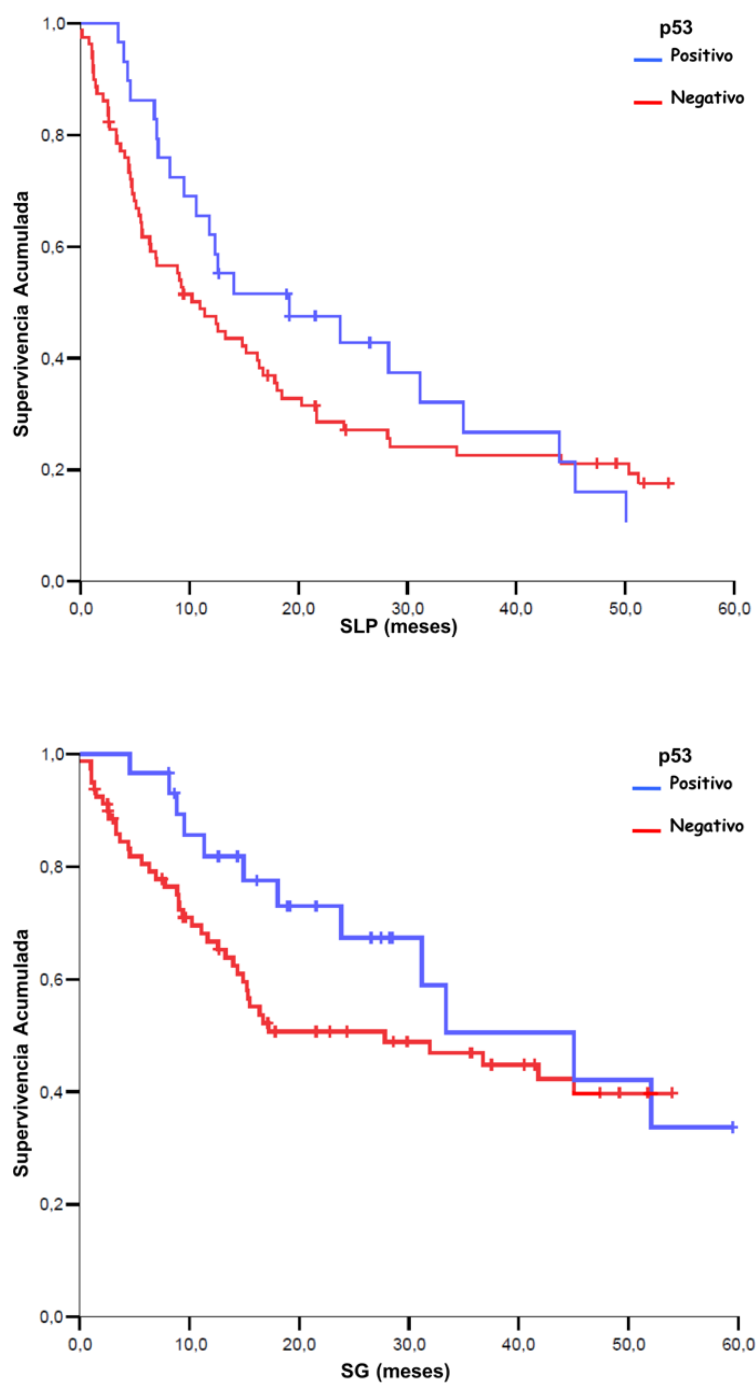


Figura IV. 25. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de p53. SLP ($p=0,446$), SG ($p=0,341$).

5.4.4. PÉRDIDA DE ATRX.

La pérdida de ATRX se asoció a una mejor evolución clínica de los pacientes, tanto la supervivencia libre de enfermedad como la supervivencia global fueron mayores en los pacientes con esta alteración genética con una diferencia estadísticamente significativa (Figura IV.26).

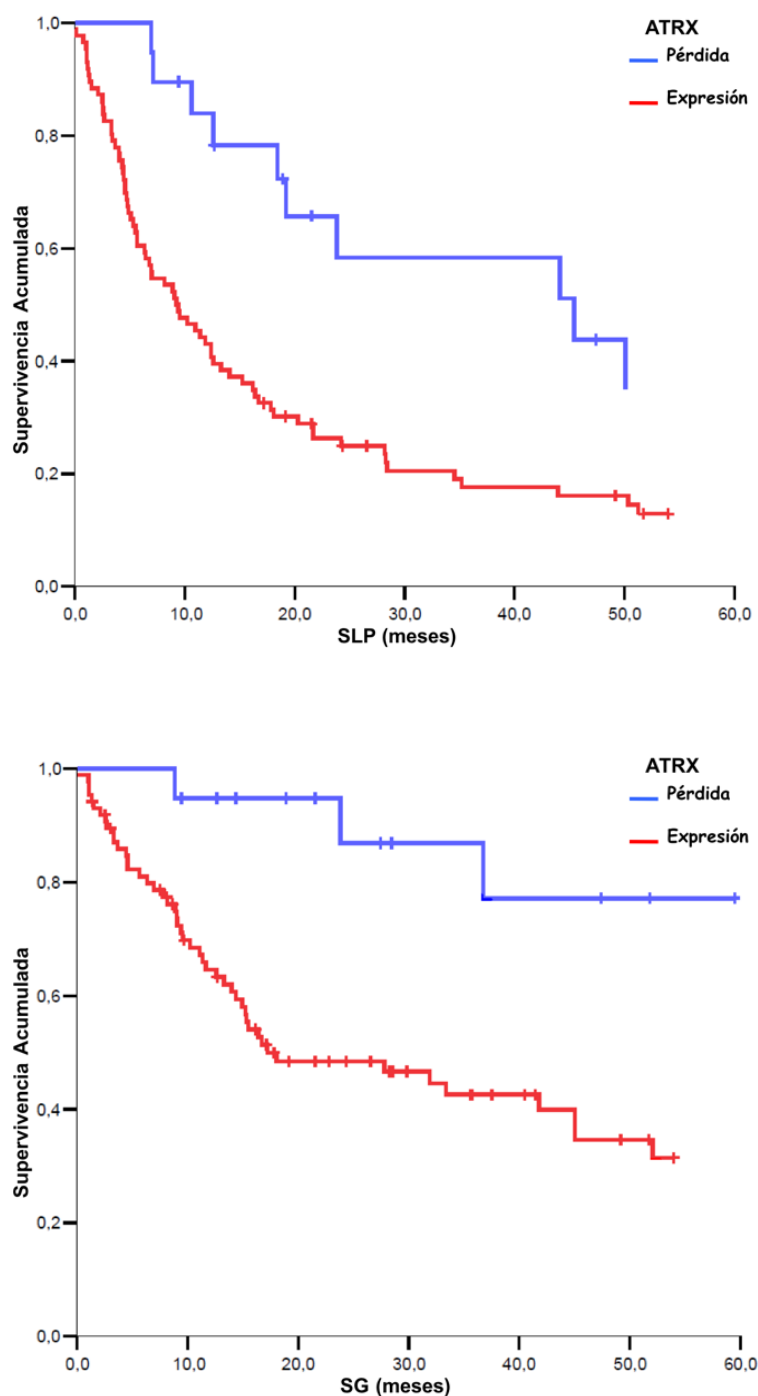


Figura IV.26. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la pérdida de ATRX. SLP ($p=0,006$), SG ($p=0,009$).

5.4.5. AMPLIFICACIÓN DE EGFR Y PRESENCIA DE EGFRvIII.

La amplificación de EGFR se consideró un factor de mal pronóstico, las medianas de supervivencia libre de enfermedad fueron de 5 meses en los pacientes con amplificación de EGFR frente a 15 meses en los pacientes sin amplificación del gen, las medianas de supervivencia global fueron de 9 meses frente a 22 meses respectivamente, las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Figura IV.27).

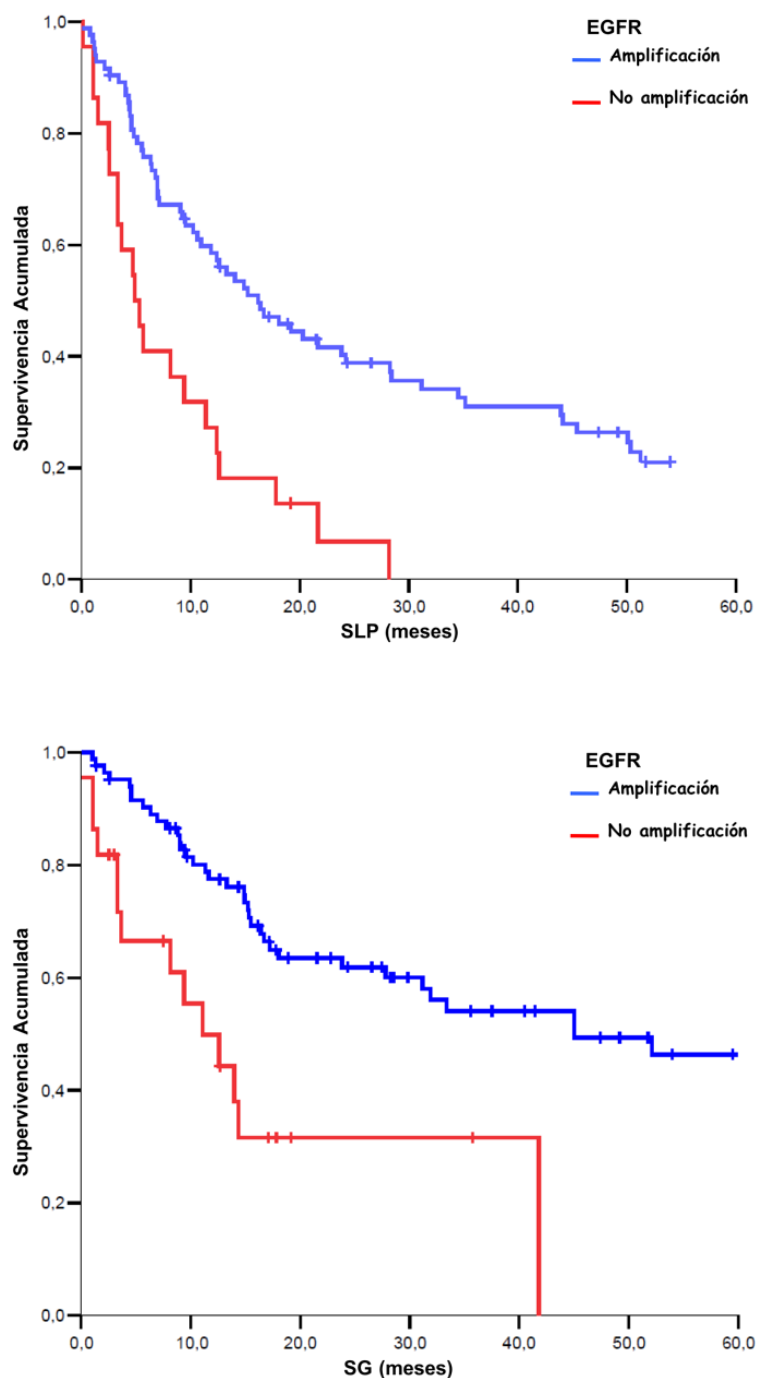


Figura IV.27. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la amplificación de EGFR ($p < 0,001$ para la SLP y la SG).

Sin embargo, el estudio de este marcador en los glioblastomas no supone un factor pronóstico, el análisis de supervivencia en función de este marcador en los pacientes con glioblastoma no mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura IV.28).

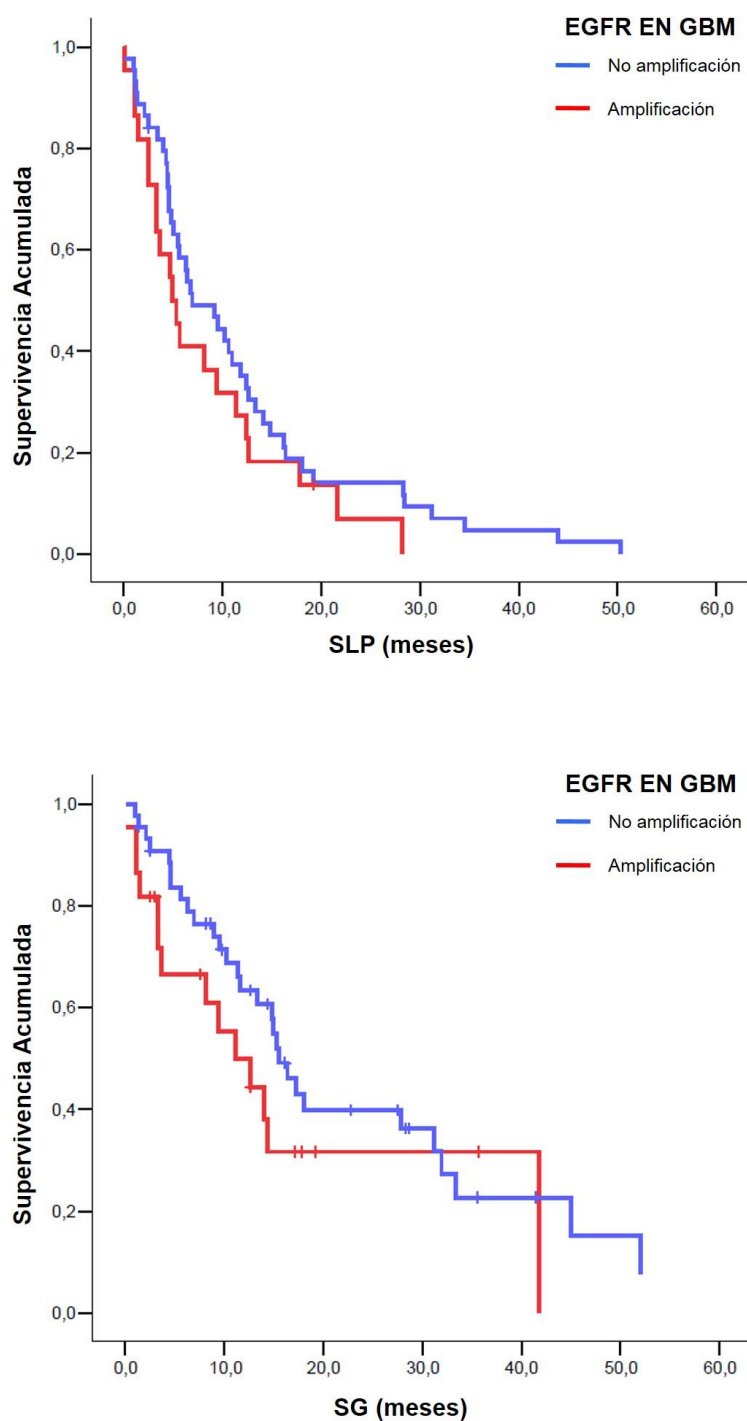


Figura IV.28. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la amplificación de EGFR en GBM. SLP ($p=0,218$), SG ($p=0,225$).

Los pacientes en los que se detectó la presencia de EGFRvIII presentaron una mediana de supervivencia libre de enfermedad de 9 meses y una mediana de supervivencia global de 10 meses, mientras que en aquellos que no presentaron esta mutación las medianas de supervivencia fueron de 6 y 13 meses respectivamente. Las diferencias en la supervivencia en función de EGFRvIII no fueron significativas (Figura IV.29).

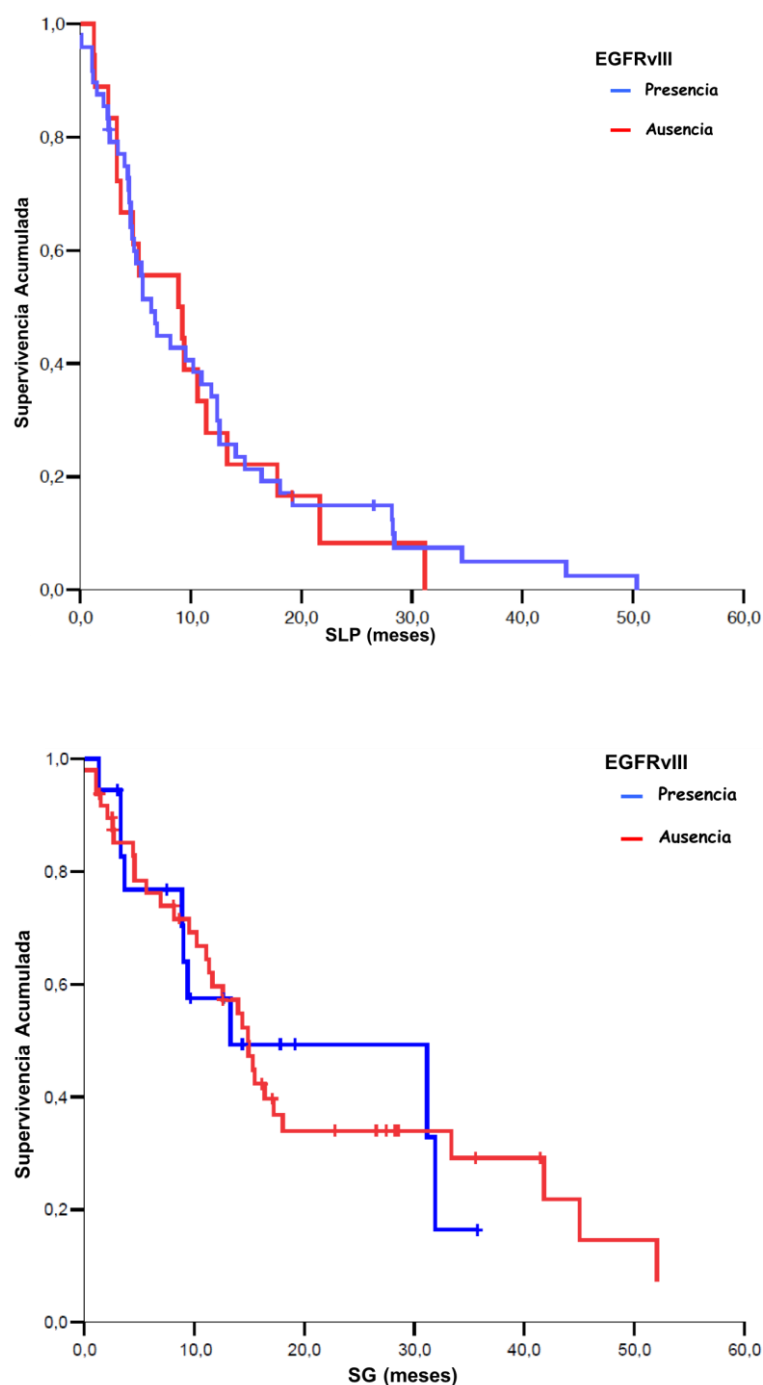


Figura IV.29. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la presencia de EGFRvIII. SLP ($p=0,818$), SG ($P=0,927$).

5.4.6. METILACIÓN DE MGMT.

La presencia de la metilación del promotor del gen del MGMT se asoció a una mayor supervivencia libre de enfermedad ($p=0,016$), sin embargo las diferencias en la supervivencia global no fueron significativas ($p=0,16$). Las medianas de supervivencia libre de enfermedad fueron de 17 meses para los pacientes con metilación de MGMT frente a 9 meses para aquellos sin metilación del promotor del gen, las medianas de

supervivencia global fueron de 22 meses frente a 13 meses respectivamente (Figura IV.30).

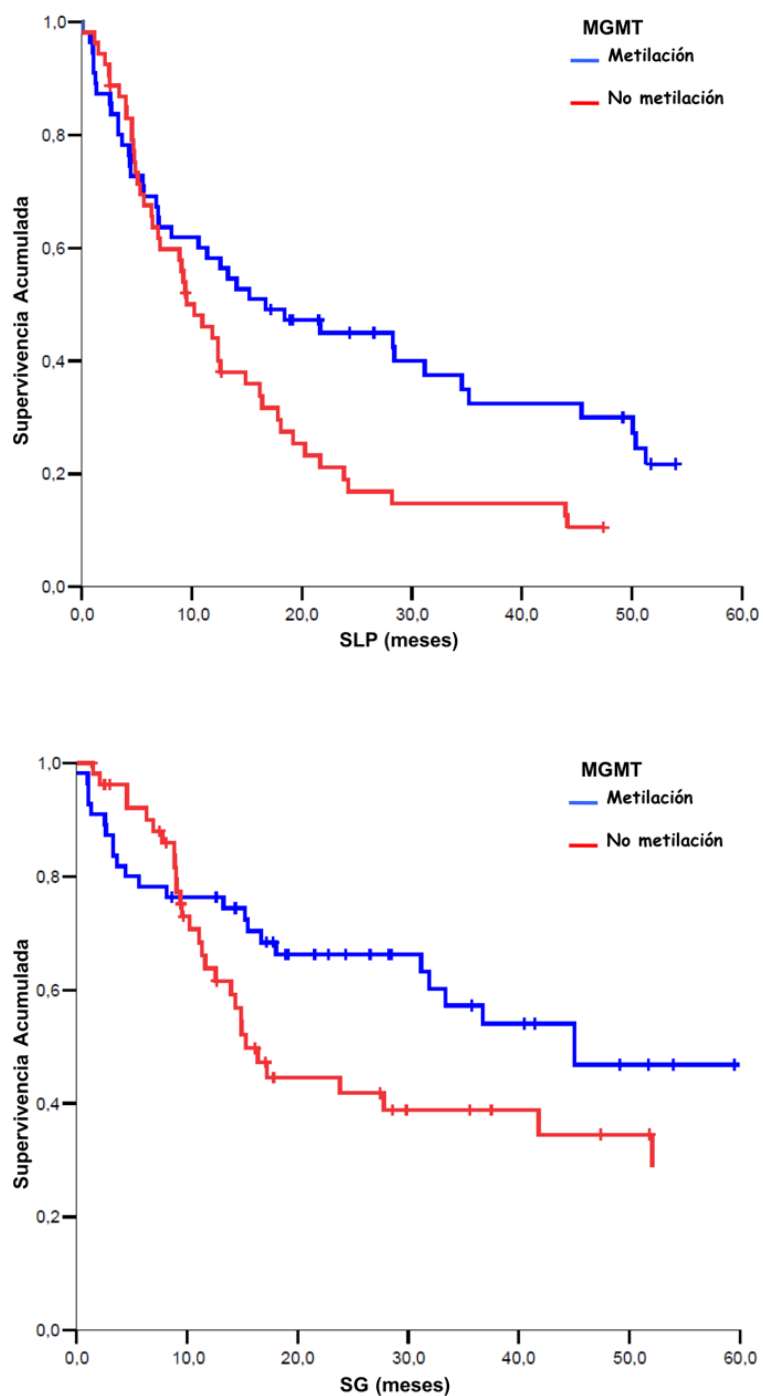


Figura IV.30. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la metilación de MGMT. SLP ($P=0,016$), SG ($P=0,16$).

6. RESPUESTA A TRATAMIENTO.

Se analizó el valor de la metilación de MGMT como factor predictivo de respuesta al tratamiento adyuvante con radioterapia o quimioterapia o la combinación de radioterapia y quimioterapia en aquellos pacientes sometidos a cirugía.

De los 87 pacientes operados mediante cirugía el 49,4% de los casos (43 casos) presentó metilación de MGMT frente al 50,6% de los casos (44 casos) sin metilación del promotor del gen.

Entre los pacientes con metilación, 33 han recibido tratamiento adyuvante, en estos pacientes la mediana de supervivencia libre de enfermedad fue de 27 meses y la mediana de supervivencia global de 36 meses. Sin embargo, para los pacientes sin metilación de MGMT que han recibido tratamiento adyuvante (32 casos), la mediana de supervivencia libre de enfermedad fue de 10 meses y la mediana de supervivencia global de 13 meses (Figura IV.31), las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p<0,001$).

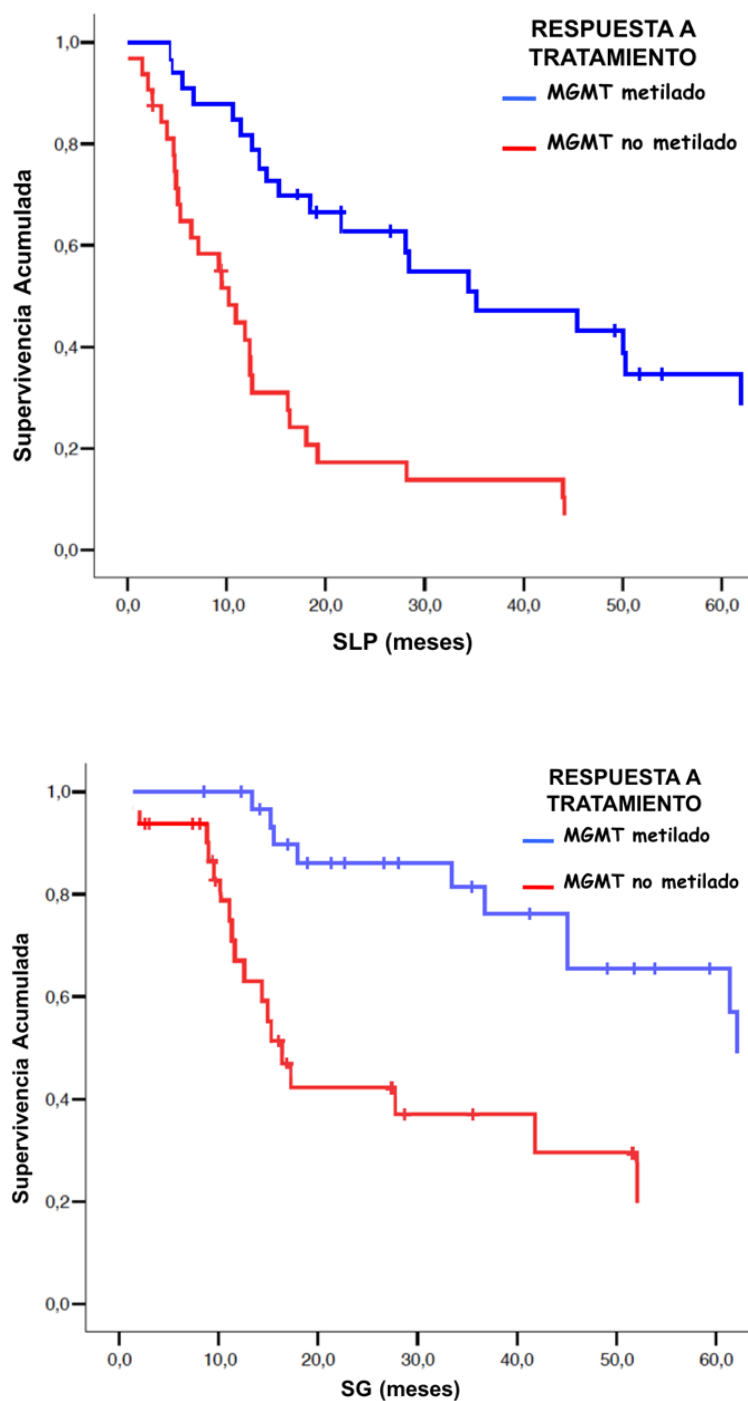


Figura IV. 31. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la metilación de MGMT en pacientes con tratamiento adyuvante ($p < 0,001$ para la SLP y SG).

Por último, se analizó la respuesta a la adyuvancia en los pacientes tratados con cirugía en función de la metilación de MGMT en combinación con la mutación de IDH1 en comparación con los gliomas con metilación de MGMT sin mutación de IDH1.

De los 33 pacientes sometidos a cirugía que han recibido tratamiento adyuvante y han presentado metilación del promotor del gen de MGMT, el 48,5% mostraron además mutación del gen de IDH1 (16 casos) frente al 51,5% de los casos sin mutación de IDH1

(17 casos). La supervivencia fue significativamente mayor en el primer grupo en comparación con el segundo, las medianas de supervivencia libre de enfermedad fueron de 51 meses frente a 19 meses respectivamente ($p<0,001$), y las medianas de supervivencia global fueron de 57 meses frente a 27 meses ($p=0,012$) (Figura IV.32).

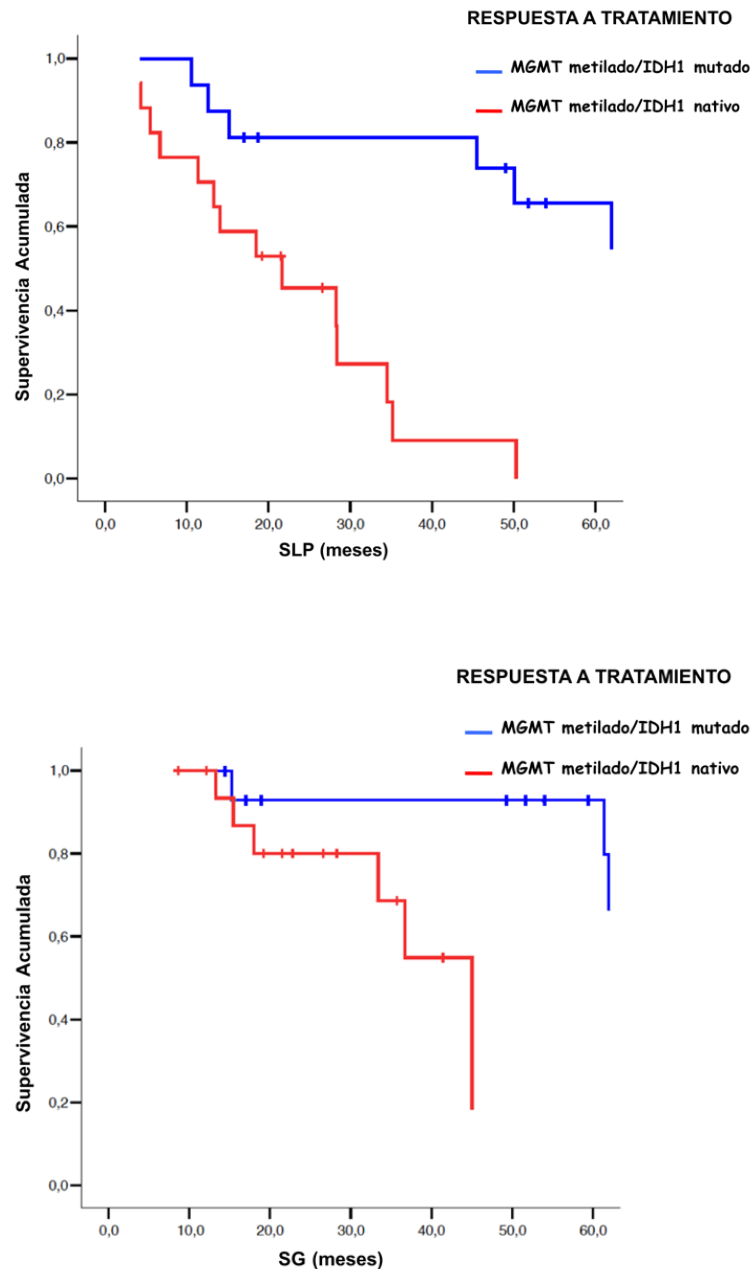


Figura IV. 32. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de la metilación de MGMT y la mutación de IDH1 en pacientes con tratamiento adyuvante. SLP ($p<0,001$), SG ($p=0,012$).

7. SUBTIPOS MOLECULARES.

7.1. ASOCIACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS MOLECULARES.

7.1.1. ASOCIACIONES DE LA MUTACIÓN DEL GEN DE IDH1.

Se detectó mutación del gen de IDH1 en 33 casos, de los cuales el 53,3% presentó codeleción del 1p19q (16/33 casos), el 33,3% p53 positivo (11/33 casos), el 48,5% mostró pérdida de ATRX (16/33 casos), no se detectó amplificación del gen de EGFR en ningún caso y el 66,7% de los casos presentó metilación de MGMT.

Se evidenció una asociación estadísticamente significativa de la mutación del gen de IDH1 con la codeleción de 1p19q ($p<0,001$), la pérdida de ATRX, ($P<0,001$), EGFR intacto ($p<0,001$) y metilación del MGMT ($p=0,024$). No se objetivó una asociación significativa con la sobreexpresión de p53 (Tabla IV.30).

		Mutación IDH1				
		Si			No	
	Nº casos	Nº	%	Nº	%	p
	108	33	30,6	75	69,4	
Codeleción 1p19q*						<0,001
	Si	18	16	53,3	2	2,7
	No	85	14	46,7	71	97,3
P53						0,218
	Positivo	29	11	33,3	18	24
	Negativo	79	22	66,7	57	76
Pérdida ATRX*						<0,001
	Si	19	16	48,5	3	4,2
	No	86	17	51,5	69	95,8
Amplificación EGFR*						<0,001
	Si	22	0	0	22	30,6
	No	83	33	100	50	69,4
Metilación MGMT						0,024
	Si	55	22	66,7	33	44
	No	53	11	33,3	42	56

Tabla IV.30. Parámetros moleculares en función de la mutación de IDH1. *No se obtuvieron todos los resultados.

7.1.2. ASOCIACIONES DE LA CODELECCIÓN 1P19Q.

Se detectó codeleción de 1p19q en 18 casos, de los cuales el 88,9% presentó mutación del gen de IDH1 (16/18 casos), no se detectó sobreexpresión de p53 ni pérdida de ATRX ni amplificación de EGFR en ningún caso con codeleción de 1p19q, y en un 72,2% de los casos se objetivó metilación de MGMT (13/18 casos). La codeleción de 1p19q se asoció de manera significativa a la mutación de IDH1 ($p<0,001$), p53 negativo ($p=0,003$), conservación de ATRX ($p=0,025$), EGFR intacto ($p=0,007$) y a la metilación de MGMT ($p=0,037$) (Tabla IV.31).

		Codeleción 1p19q *					
		SI			NO		
	Nº casos	Nº	%	Nº	%	p	
	108	18	16,7	85	78,7		
Mutación IDH1							<0,001
Si	33	16	88,9	14	16,5		
No	75	2	11,1	71	83,5		
P53							0,003
Positivo	29	0	0	26	30,6		
Negativo	79	18	100	59	69,4		
Pérdida ATRX *							0,025
Si	19	0	0	17	20,5		
No	86	18	100	66	79,5		
Amplificación EGFR *							0,007
Si	22	0	0	22	26,5		
No	83	18	100	61	73,5		
Metilación MGMT							0,037
Si	55	13	72,2	39	45,9		
No	53	5	27,8	46	54,1		

Tabla IV.31. Parámetros moleculares en función de la codeleción 1p19q. *No se obtuvieron todos los resultados.

7.1.3. ASOCIACIONES DE P53.

Mediante estudio IHQ, se detectó p53 positivo en 29 casos, de los cuales el 37,9% presentó mutación de IDH1, el 46,4% mostró pérdida de ATRX (13/29) y el 6,9% amplificación de EGFR (2/29 casos), en ningún caso se objetivó codeleción de 1p19q y en un 58,6% se detectó metilación de MGMT. Se evidenció una asociación estadísticamente significativa entre p53 positivo y la pérdida de ATRX ($p < 0,001$), 1p19q y EGFR intactos ($p = 0,003$ y $p = 0,022$ respectivamente). No se objetivó una asociación significativa con la mutación de IDH1 ni con la metilación de MGMT (Tabla IV.32).

		P53				p
		Positivo		Negativo		
	Nº casos 108	Nº 29	% 26,9	Nº 79	% 73,1	
Mutación IDH1						0,218
	Si	11	37,9	22	27,8	
	No	18	62,1	57	72,2	
Codeleción 1p19q *						0,003
	Si	0	0	18	23,4	
	No	26	100	59	76,6	
Pérdida ATRX *						<0,001
	Si	13	46,4	6	7,8	
	No	15	53,6	71	92,2	
Amplificación EGFR *						0,022
	Si	2	6,9	20	26,3	
	No	27	93,1	56	73,7	
Metilación MGMT						0,226
	Si	17	58,6	38	48,1	
	No	12	41,4	41	51,9	

Tabla IV.32. Parámetros moleculares en función de p53. *No se obtuvieron todos los resultados.

7.1.4. ASOCIACIONES DE LA PÉRDIDA DE ATRX.

Se detectó pérdida de ATRX en 18 casos, de los cuales el 84,2% presentó mutación del gen de IDH1 (16/18 casos) y el 68,4% p53 positivo (13/18 casos), no se detectó codeleción de 1p19q ni amplificación de EGFR. El 57,9% de los casos mostraron metilación de MGMT (11/18 casos). Se evidenció una asociación estadísticamente significativa entre la pérdida de ATRX y la mutación de IDH1 ($P<0,001$), p53 positivo ($p<0,001$), 1p19q y EGFR intactos ($p=0,025$ y $p=0,008$ respectivamente). No se objetivó una asociación significativa con la metilación de MGMT (Tabla IV.33).

		Pérdida ATRX					
		Si			No		
	Nº casos	Nº	%	Nº	%	p	
	108	19	17,6	86	79,6		
Mutación IDH1							<0,001
Si	33	16	84,2	17	19,8		
No	75	3	15,8	69	80,2		
Codeleción 1p19q *							0,025
Si	18	0	0	18	21,4		
No	85	17	100	66	78,6		
P53							<0,001
Positivo	29	13	68,4	15	17,4		
Negativo	79	6	31,5	71	82,6		
Amplificación EGFR *							0,008
Si	22	0	0	22	26,2		
No	83	18	100	62	73,8		
Metilación MGMT							0,357
Si	55	11	57,9	43	50		
No	53	8	42,1	43	50		

Tabla IV.33. Parámetros moleculares en función de la pérdida de ATRX. *No se obtuvieron todos los resultados.

7.1.5. ASOCIACIONES DE LA AMPLIFICACIÓN DE EGFR.

Se detectó amplificación del gen de EGFR en 22 casos, de los cuales ninguno mostró mutación de IDH1 ni codeleción 1p19q ni pérdida de ATRX. Se detectó p53 positivo en el 9,1% de los casos (2/22) y la metilación de MGMT en el 45,5% de los casos (10/22). Por tanto la amplificación de EGFR y el resto de alteraciones moleculares (mutación de IDH1, codeleción de 1p19q, pérdida de ATRX y p53 positivo) fueron mutuamente excluyentes con unas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$; $p = 0,007$; $p = 0,008$ y $p = 0,022$ respectivamente). No se objetivó una asociación significativa con la metilación de MGMT (Tabla IV.34).

		Amplificación EGFR *					
		SI			NO		
	Nº casos	Nº	%	Nº	%	p	
	108	22	20,4	83	76,9		
Mutación IDH1							<0,001
Si	33	0	0	33	39,8		
No	75	22	100	50	60,2		
Codeleción 1p19q *							0,007
Si	18	0	0	18	22,8		
No	85	22	100	61	77,2		
p53							0,022
Positivo	29	2	9,1	27	32,5		
Negativo	79	20	90,1	56	67,5		
Pérdida ATRX *							0,008
Si	19	0	0	18	22,5		
No	86	22	100	62	77,5		
Metilación MGMT							0,386
Si	55	10	45,5	43	51,8		
No	53	12	54,5	40	48,2		

Tabla IV.34. Parámetros moleculares en función de la amplificación de EGFR. *No se obtuvieron todos los resultados.

7.1.6. ASOCIACIONES DE LA METILACIÓN DEL MGMT.

Se detectó metilación de MGMT en 55 casos, de los cuales el 40% presentó mutación de IDH1 (22/55 casos), el 25% codeleción de 1p19q (13/55 casos), el 30,9% sobreexpresión de p53 (17/55 casos), el 20,4% pérdida de ATRX (11/55 casos) y el 18,9% amplificación de EGFR (10/55 casos). Únicamente se objetivó una asociación estadísticamente significativa de la metilación de MGMT con la mutación de IDH1 ($p=0,024$) y la codeleción 1p19q ($p=0,037$) (Tabla IV.35).

		Metilación MGMT					
		SI			NO		
	Nº casos	Nº	%	Nº	%	p	
	108	55	50,9	53	49,1		
Mutación IDH1							0,024
Si	33	22	40	11	20,8		
No	75	33	60	42	79,2		
Codeleción 1p19q *							0,037
Si	18	13	25	5	9,8		
No	85	39	75	46	90,2		
p53							0,226
Positivo	29	17	30,9	12	22,6		
Negativo	79	38	69,1	41	77,4		
Pérdida ATRX *							0,357
Si	19	11	20,4	8	15,7		
No	86	43	79,6	43	84,3		
Amplificación EGFR							0,386
Si	22	10	18,9	12	23,1		
No	83	43	81,1	40	76,9		

Tabla IV.35. Parámetros moleculares en función de la metilación de MGMT. *No se obtuvieron todos los resultados.

7.2. CLASIFICACIÓN MOLECULAR.

En función del estado del gen de IDH1, se distinguen dos grupos pronósticos con distintas características clínicas, histológicas y moleculares.

El grupo con ***IDH1 nativo (Grupo C)*** representa el de peor pronóstico, la mediana de edad de diagnóstico de los pacientes fue de 57 años, este grupo estuvo formado principalmente por glioblastomas (87% de los casos). El 31% de los casos presentaron amplificación de EGFR y el 24% de los casos sobre-expresión de p53, sin embargo las diferencias en la supervivencia en función de estos marcadores no fue significativa.

El segundo grupo principal, formado por los gliomas con mutación del gen de IDH1, los pacientes de este grupo fueron más jóvenes con una mediana de edad de 38 años, el tipo histológico predominante fue el oligodendroglioma (51%) y el grado histológico fue el grado II (64%).

El 48% de los gliomas con mutación de IDH1 presentaron codeleción 1p19q, el 42% p53 positivo y el 48% pérdida de ATRX. La codeleción 1p19q fue mutuamente excluyente con la pérdida de ATRX y la sobreexpresión de p53 permitiendo distinguir 2 subgrupos dentro de los tumores con mutación de IDH1:

IDH1 mutado/ Codeleción 1p19q (Grupo A)

La mediana de edad de los pacientes fue de 35 años, la mediana de supervivencia libre de enfermedad de 49 meses y la mediana de supervivencia global de 52 meses. Este grupo estuvo formado únicamente por oligodendrogliomas. No se detectó pérdida de ATRX en ningún caso y únicamente un caso mostró p53 positivo.

IDH1 mutado/ Pérdida de ATRX/ p53 positivo (Grupo B)

La mediana de edad de los pacientes fue de 41 años, la mediana de supervivencia libre de enfermedad de 34 meses y la mediana de supervivencia global de 38 meses. Histológicamente estuvo formado únicamente por astrocitomas y no se detectó codeleción 1p19q en ningún caso.

El análisis de supervivencia mostró diferencias significativas entre los 3 grupos moleculares ($p < 0,001$) (Figura IV.33).

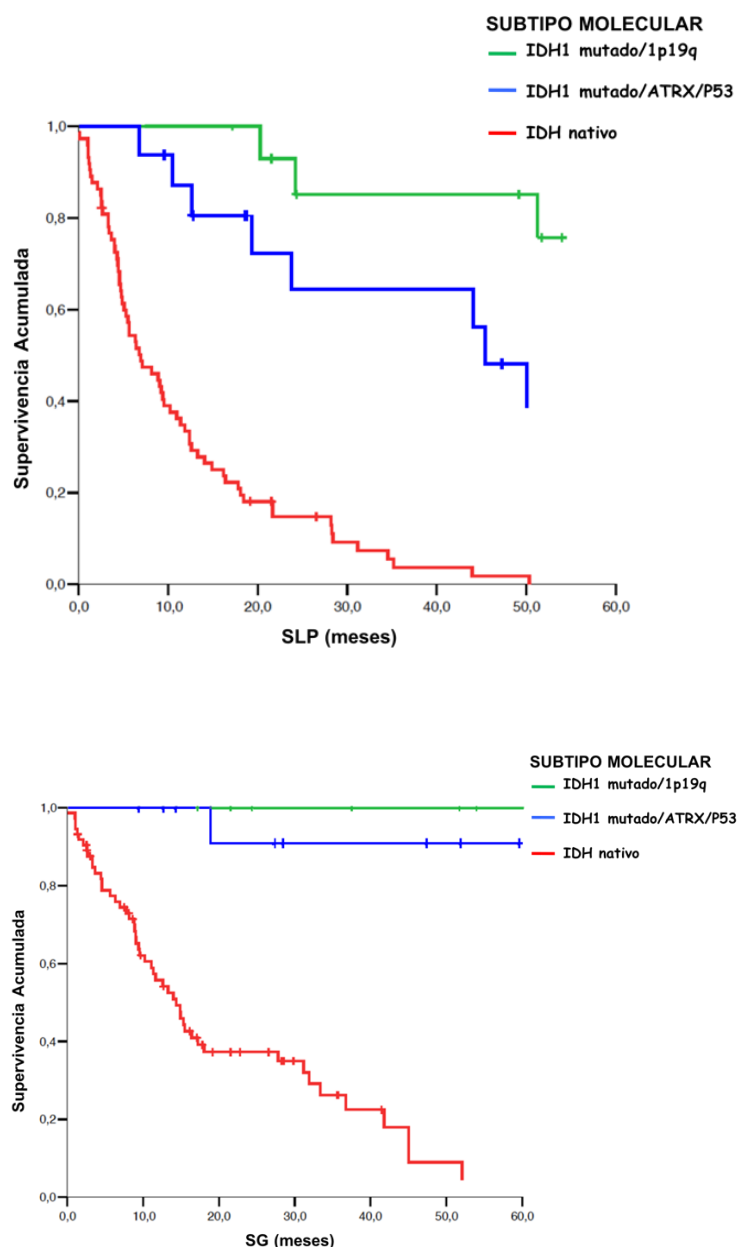


Figura IV.33. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en función de los subtipos moleculares ($p < 0,001$ para la SLP y SG).

El análisis de regresión de Cox para definir los riesgos relativos del grado histológico y de la clasificación molecular sugiere una superioridad en esta última para identificar

subgrupos de pacientes con pronósticos diferenciales. De hecho, el grado III no es significativo para identificar un peor pronóstico ($p=0.643$, HR: 1.24; IC95%: 0.49-3.14), aunque el grado IV sí se asocia claramente a un curso peor ($p<0.001$, HR: 7.58; IC95%:3,71-15,45). El subtipo molecular resulta ser un factor pronóstico en todas sus categorías: Grupo A ($p<0,001$, HR: 1; IC95%), Grupo B ($p=0,04$, HR: 2,99; IC 95%: 1,04-8,54) y Grupo C ($p<0,001$, HR: 19,56; IC 95%: 6,93-15,21) (Tabla IV.36).

		Univariado SLP		
		Significancia	HR	IC95
Grado	II	$p<0,001$	1	
	III	$p=0,643$	1,24	(0,49-3,14)
	IV	$p<0,001$	7,58	(3,71-15,45)
Subtipo molecular	A	$p<0,001$	1	
	B	$p=0,040$	2,99	(1,04-8,54)
	C	$p<0,001$	19,56	(6,93-15,21)

Tabla IV.36. Análisis univariado de Cox de la SLP para el grado histológico y el subtipo molecular.

7.3. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE SUPERVIVENCIA

Realizamos un estudio multivariado mediante regresión de Cox incluyendo todas las variables clínicas, patológicas y moleculares que resultaron significativas para SLP y SG con el fin de determinar qué factores eran independientes en la predicción de la evolución de la enfermedad.

Este análisis mostró que el subtipo molecular, el grado histológico, la cirugía, la localización del tumor y la metilación del gen de MGMT eran variables con un factor pronóstico independiente relevante para la SLP en este modelo (Tabla IV.37).

		Multivariado SLP		
		Significancia	HR	IC95
Edad		0,171		
	<50 años		1	
	≥50 años		1,54	0,83-2,88
Localización		0,78		
	Frontal		1	
	Temporal		0,14	0,71-1,85
	Parietal		2,36	1,23-4,52
	Profunda		3,52	1,48-8,36
Cirugía		0,36		
	Completa		1	
	Parcial		0,80	0,33-1,96
	Biopsia		2,65	1,19-5,91
Grado histológico		0,029		
	II		1	
	III		1,24	0,49-3,14
	IV		7,58	3,71-15,45
Tipo Histológico		0,229		
	Astrocitoma		1	
	Oligodendroglioma		0,53	0,23-1,25
	Glioblastoma		5,37	2,8-10,28
Ki67		0,117		
	<10%		1	
	≥10%		1,96	0,84-4,54
EGFR		0,371		
	No amplificado		1	
	Amplificado		2,81	1,67-4,72
MGMT		0,045		
	No metilado		1	
	Metilado		0,58	0,34-0,99
Subtipo molecular		0,002		
	A		1	
	B		2,99	1,04-8,54
	C		19,56	6,93-55,21

Tabla IV.37. Análisis multivariado de Cox para la SLP.

El estudio multivariado mediante regresión de Cox para la SG demostró que la edad, el subtipo molecular y la cirugía son factores pronósticos independientes en este modelo (Tabla IV.38).

		Multivariado SG		
		Significancia	HR	IC95
Edad		0,030		
	<50 años		1	
	≥50 años		2,79	1,11-7,02
Localización		0,572		
	Frontal		1	
	Temporal		0,93	0,49-1,74
	Parietal		2,36	1,05-5,27
	Profunda		7,27	2,83-18,66
Cirugía		<0,001		
	Completa		1	
	Parcial		0,69	0,19-2,48
	Biopsia		6,57	2,45-17,64
Grado histológico		0,801		
	II		1	
	III		1,94	0,55-6,81
	IV		9,64	3,57-25,09
Tipo Histológico		0,923		
	Astrocitoma		1	
	Oligodendroglioma		0,21	0,05-1,01
	Glioblastoma		4,32	1,97-9,46
Ki67		0,323		
	<10%		1	
	≥10%		1,890	0,53-6,68
EGFR		0,592		
	No amplificado		1	
	Amplificado		2,97	1,57-5,62
Subtipo molecular		0,004		
	A		1	
	B		2,47	0,88-6,95
	C		15,78	5,98-41,64

Tabla IV.38. Análisis multivariado de Cox para la SLP.

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

Los gliomas difusos suponen las neoplasias primarias más frecuentes del SNC y se clasifican en función de criterios morfológicos y parámetros moleculares incorporados recientemente por la OMS en varios tipos y grados histológicos incluyendo astrocitomas grado II-III, oligoastrocitomas grado II-III, oligodendrogliomas grado II-III y glioblastomas grado IV.

Para determinar el tipo histológico, hasta hace poco, la clasificación de 2007 se basaba fundamentalmente en la similitud morfológica entre las células tumorales y las no neoplásicas además de algunas características arquitecturales. El grado histológico dependía del hallazgo de los 4 criterios histológicos de Daumas-Duport (atipia nuclear, figuras de mitosis, hiperplasia endotelial y necrosis).

En los últimos años, gracias a un mayor conocimiento de la biología molecular de los tumores cerebrales, se han descrito múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas relacionadas con estos tumores, de las cuales algunas se han incluido en la reciente clasificación del 2016. La incorporación de los estudios moleculares permite realizar un diagnóstico más preciso, además de ofrecer terapias más personalizadas a los pacientes con gliomas difusos.

Diferentes autores señalan la importancia de la edad en la evolución y la supervivencia de los pacientes con gliomas cerebrales, independientemente de otros factores como el diagnóstico histológico, el tamaño tumoral, el índice de Karnofsky, la extensión de la resección o el tratamiento adyuvante a la biopsia o cirugía [107-111], nuestro estudio corrobora estos hallazgos evidenciando un claro incremento en la supervivencia de los pacientes menores de 50 años en comparación con el grupo de pacientes mayores de 50 años con unas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

Según Louis et al. [57], el astrocitoma grado histológico II muestra un pico de incidencia entre 30-40 años con una media de edad de 34 años. Aproximadamente un 10% se producen antes de los 20 años, el 60% entre 20-45 años y alrededor de un 30% después de los 45 años. En nuestra serie, disponemos de 9 astrocitomas grado histológico II con una media de edad de 39 años, también fueron más frecuentes entre los 20 y 45 años con un 78% de los casos, el 22% se presentó después de los 45 años y en ningún caso se manifestó antes de los 20 años.

La media de supervivencia descrita para estos tumores es de entre 6-8 años, en nuestra serie, el rango de seguimiento de los pacientes es de entre 9 y 210 meses con una supervivencia del 89%.

En los astrocitomas anaplásicos la edad media de diagnóstico en nuestra serie fue de 46 años similar a la descrita en la literatura [57]. Los pacientes con astrocitoma grado III tienden a progresar a los 48 meses a glioblastoma [57, 112]. En nuestra serie el tiempo medio de progresión fue de 30 meses.

Los glioblastomas muestran un pico de incidencia entre 45-71 años según la literatura [57], y la media de edad descrita es de 61,3 años [57, 112], más del 80% de los pacientes suelen ser mayores de 50 años y únicamente se presenta en un 1% de los casos [57, 112]. La distribución por edad en nuestro grupo de glioblastomas fue similar a la descrita, la media de edad fue de 60 años, el 76% de los pacientes fueron mayores de 50 años y no hubo ningún en los menores de 20 años.

La supervivencia de los pacientes con glioblastoma es muy baja, se ha descrito una media de 12 meses [57], estudios que implican amplias series han demostrado que menos de un 20% de los pacientes viven más de un año y que alrededor del 3% superan los 3 años de supervivencia [112, 113]. En nuestra serie las tasas de supervivencia fueron mayores, con una supervivencia media de 15 meses, al año han sobrevivido el 48% de los pacientes y a los 3 años un 7 % de los pacientes.

En cuanto a los tumores oligodendrogiales, muestran un pico de incidencia entre los 40 y 45 años [57], la media de edad de nuestros pacientes fue de 38 años. Son tumores de lento crecimiento, las supervivencias descritas a los 10 años son del 51% de los casos [57, 113]. En nuestra serie, de los 19 casos de oligodendroglioma, únicamente falleció 1 paciente, el tiempo máximo de seguimiento del que disponemos es de 6 años, con un 95% de supervivencia.

En nuestro estudio de 108 gliomas difusos, el 30,6% de los casos presentó mutación del gen de IDH1, siendo la más frecuente la R132H (88%) que implica la sustitución de una arginina por una histidina en el residuo 132.

La presencia de la mutación de IDH se ha descrito en el 60-65% de los astrocitomas supratentoriales, 75-80% de los oligodendrogliomas, 80% de los glioblastomas secundarios y únicamente en el 5% de los glioblastomas primarios [74, 114-116]. Nuestros resultados fueron similares, se detectó mutación del gen de IDH1 en el 61,9% de los astrocitomas y en el 89,5% de los oligodendrogliomas. En cuanto a los glioblastomas, se detectó mutación del gen de IDH1 en el 100% de los glioblastomas secundarios y en el 1,5% de los glioblastomas primarios.

La distribución de esta alteración genética en función del grado histológico muestra que es significativamente más frecuente en los gliomas grado II y III (87,5% y 56,3% respectivamente) que en los gliomas grado IV (4,4%), resultados similares evidenciaron Balss et al. analizando la mutación de IDH1 en el codón 132 en los tumores cerebrales [117], Sanson et al. [94] detectaron mutación del gen de IDH1 en el 77% de los gliomas grado histológico II, en 55% de los gliomas grado histológico III y en el 6% de los gliomas grado histológico IV.

Por lo tanto, la mutación del gen de IDH juega un papel diagnóstico en el estudio de los gliomas difusos permitiendo diferenciar entre los glioblastomas primarios y secundarios como hemos comprobado en nuestra serie. Sin embargo, no discrimina entre los subtipos histológicos confirmando que es una alteración que acontece en las primeras fases del desarrollo de los gliomas, incluso antes de la diferenciación a oligodendroglioma o astrocitoma.

Numerosos estudios han demostrado la alta prevalencia de la mutación del gen de IDH en los gliomas difusos en comparación con otras lesiones cerebrales [117, 118], permitiendo así, su uso como marcador diagnóstico para diferenciar entre los gliomas de bajo grado y otras entidades histológicamente similares, por ejemplo en el caso del oligodendroglioma, la detección de la mutación permite distinguir este tumor de otras entidades morfológicamente similares como el neurocitoma central o el ependimoma de células claras. Por último, cabe destacar el papel fundamental que juega este marcador a la hora de diferenciar entre astrocitoma difuso y gliosis reactiva o gliomas delimitados como el astrocitoma pilocítico o el xantoastrocitoma pleomórfico.

Los primeros estudios que identificaron las mutaciones del gen de IDH en los tumores gliales, revelaron además que los pacientes que presentaban esta alteración genética, mostraban características clínicas distintas a aquellos que no tenían la mutación del gen.

En nuestro análisis, así como en numerosos trabajos previos [119-123] la mutación del gen de IDH1 juega un papel pronóstico relevante, la supervivencia fue significativamente mayor en los pacientes con la mutación en comparación con aquellos que no presentaron esta alteración, las medianas de supervivencia libre de enfermedad fueron de 44 frente a 7 meses, y las medianas de supervivencia global de 49 meses frente a 12 meses respectivamente.

Además, constatamos que los pacientes con mutación del gen de IDH1 son significativamente más jóvenes que aquellos que no presentan la mutación del gen, las medianas de edad de diagnóstico fueron de 38 años frente a 57 años respectivamente. Estudios previos confirman estos resultados [73, 114, 115, 117] Sin embargo, en un análisis de 558 gliomas grado II-III de la OMS, Olar et al. comprueban que la edad no es un factor predictivo de supervivencia en el grupo de pacientes con mutación de IDH, mientras que en el grupo carente de esta mutación evidencian unas diferencias muy llamativas en la supervivencia de los pacientes en función de la edad [77].

Antes de la publicación de la última clasificación de la OMS de 2016, numerosos estudios evaluaron el valor pronóstico de la mutación de IDH en función del grado histológico, mientras que este estaba claramente establecido en los gliomas difusos grado III y IV de la OMS [123], los resultados en cuanto a los gliomas grado II eran controvertidos. Un estudio de 49 pacientes con astrocitoma difuso mostró una asociación entre la presencia de la mutación de IDH y un incremento en la supervivencia global [124]. En el análisis de Sanson et al., donde se evaluaron 404 gliomas difusos II – IV (de los cuales 100 eran grado II), el análisis univariado demostró

que IDH1 supone un factor de buen pronóstico en los gliomas difusos, y en el análisis multivariado se confirmó este resultado señalando además que es un marcador pronóstico de mayor supervivencia global independientemente de los otros factores como la edad, el grado histológico, el tratamiento y las alteraciones genéticas [94]. En cambio, los grupos de Kim y Mukasa, después de analizar series de 360 y 250 casos respectivamente, señalan que la presencia de las mutaciones de IDH no son pronósticas de supervivencia en los pacientes con glioma de bajo grado [82, 125]. Con el fin de aclarar estas diferencias, Olar et al. evaluaron el impacto pronóstico del índice mitótico sobre los pacientes con y sin mutación de IDH, sus resultados indican que el número de mitosis no influye en el pronóstico de los gliomas con mutación del gen y que la importancia de este criterio histológico se limita a los casos con IDH nativo [77]. El papel predictivo de la mutación de IDH no está del todo claro, en nuestra serie, dentro del grupo de los pacientes que han recibido tratamiento adyuvante postquirúrgico, la supervivencia de los pacientes con la mutación del gen de IDH1 fue significativamente mayor que la de los pacientes sin mutación del gen, Zhang et al. evidencian resultados similares en gliomas difusos y anaplásicos [125] y el grupo de Houillier señala que la mutación del IDH confiere quimiosensibilidad a los gliomas difusos de bajo grado [126], sin embargo gran parte de esta mejora en la respuesta al tratamiento adyuvante podría deberse al papel pronóstico de este marcador. Recientemente, en un trabajo basado en los datos del estudio RTOG9402, Caincross et al. indican que la mutación del gen de IDH es un biomarcador predictivo de mayor supervivencia en los pacientes con oligodendroglioma anaplásico tratados con quimioterapia mediante el esquema PCV, pero no en aquellos que no han recibido el tratamiento [78].

La proteína IDH1R132H podría ser una diana potencial para el desarrollo de nuevos fármacos. Recientemente, Rohle et al. desarrollaron un inhibidor selectivo de esta enzima denominado AGI-5198. Después de observar el efecto inhibitorio de este fármaco sobre la formación de colonias celulares de gliomas humanos con la mutación IDH1R132H, comprobaron los efectos de su administración oral en xenoinjerto de glioma humano en ratón. Observaron que AGI-5198 bloquea la producción de 2-hidroxiglutarato y produce una desmetilación de histonas dosis dependiente sin llegar a alterar el fenotipo G-CIMP. El crecimiento tumoral se inhibió independientemente de la dosis, mientras que el fármaco fue bien tolerado y sin signos de toxicidad. Estos resultados parecen prometedores para un enfoque terapéutico dirigido a un subtipo específico de glioma [127].

La última clasificación de la OMS del año 2016 incorpora por primera vez la codeleción 1p19q en la clasificación de los gliomas difusos como marcador indispensable para el diagnóstico de los oligodendrogliomas.

En nuestro análisis detectamos la presencia de la codeleción 1p19q en el 16,7% de los casos, todos los gliomas con morfología oligodendroglial presentaron esta alteración y

no se evidenció en ningún tumor astrocitario en concordancia con la última clasificación de la OMS.

La presencia de la delección combinada de 1p y 19q y su relación con los oligodendrogliomas se conoce desde hace tiempo [128, 129], sin embargo, en algunos estudios se detectó la presencia de esta pérdida también en astrocitomas y glioblastomas [130, 131].

Griffin et al. sugirieron que las diferencias entre los porcentajes de delección de 1p/19q mencionados en la literatura se deben fundamentalmente a la inclusión de los tipos histológicos mixtos, la presencia de celularidad normal en los tumores analizados y los diferentes métodos de análisis [132]. Estos autores fueron los primeros en identificar la presencia de un cromosoma derivado de la traslocación entre los cromosomas 1 y 19 en un estudio citogenético realizado en 5 oligodendrogliomas [132], todos los casos presentaron la codelección por FISH, confirmando así la teoría de la traslocación balanceada que acontece antes de la pérdida completa de los brazos de los cromosomas 1 y 19.

La hibridación fluorescente in situ, es el método más empleado en el estudio de la codelección 1p19q, en nuestro análisis como en el de Griffin, ha permitido detectar la pérdida cromosómica en todos los tumores con morfología oligodendroglioma, sin embargo, hay que tener en cuenta en los casos discrepantes, que esta técnica no permite distinguir los casos con pérdida completa de los brazos de los cromosomas 1 y 19 ni otras alteraciones aberrantes [130].

Asimismo, comprobamos que la presencia de la codelección 1p19q también supone un factor de buen pronóstico para los pacientes con glioma. La mediana de supervivencia de los pacientes con la codelección fue de 49 meses mientras que la de aquellos que no presentaron la pérdida cromosómica fue de 12 meses. El papel pronóstico de este marcador se demostró en numerosos estudios previos [55, 80, 133-135]. Algunos trabajos analizaron la asociación entre esta alteración genética y la supervivencia global en los gliomas grado II según la anterior clasificación de la OMS, Felsberg et al., en un estudio que incluye 38 pacientes con oligodendroglioma grado II, mostraron mayor supervivencia en los 29 pacientes con la codelección en comparación con los 9 pacientes sin codelección, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas [136]. Kujas et al. constataron mayor supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con gliomas de bajo grado con delección de 1p en comparación con aquellos con 1p intacto, sin embargo el corto tiempo de seguimiento en este estudio no permitió demostrar una ventaja significativa en la supervivencia global de estos pacientes [137]. Mariani et al., evidenciaron en una cohorte de 79 pacientes con glioma grado II que la codelección 1p19q es un importante factor pronóstico asociado a supervivencia global en los pacientes con gliomas difusos grado II independiente del tratamiento con quimioterapia, si bien en esta serie todos los pacientes recibieron radioterapia [135].

En un estudio reciente del grupo de Gozé, analizan una serie de 64 gliomas grado II con el fin de evaluar el impacto de la codeleción 1p19q y de la mutación del gen de IDH1 sobre el ritmo de crecimiento tumoral. Sus resultados evidencian una tasa de crecimiento significativamente ($p=0,0016$) menor en los tumores con codeleción 1p19q en comparación con los tumores sin codeleción (3,4 mm/año frente a 5,9 mm/año respectivamente), demostrando así que la pérdida combinada de 1p19q favorece una ralentización en el crecimiento de los gliomas, en concordancia con el impacto favorable de esta codeleción sobre la historia natural del tumor [138].

Además de ser un factor pronóstico, la codeleción 1p19q se asocia a una mejor respuesta al tratamiento adyuvante [79, 126]. Sin embargo, en nuestra serie, por disponer de pocos casos con esta alteración genética, no se ha podido demostrar este efecto.

Las mutaciones somáticas en el gen del síndrome de α -talasemia ligado al cromosoma X (ATRX) se han descrito primero en los tumores pancreáticos neuroendocrinos (PanNET) [139] y posteriormente en los glioblastomas pediátricos [140]. Numerosos estudios señalan el papel del estudio de esta mutación en el diagnóstico de los gliomas difusos, especialmente mediante el estudio inmunohistoquímico [141, 142]. En nuestra serie, el 70% de los tumores astrocitarios presentaron pérdida de ATRX, mientras que todos los tumores con morfología oligodendroglial conservaron la expresión de la proteína. En cuanto a los glioblastomas, se detectó esta alteración en 3/68 (4,4%) casos, de estos 2 eran glioblastomas secundarios.

Entre los casos con mutación de IDH1, se detectó la pérdida de ATRX en el 100% de los astrocitomas. El grupo de Reuss et al. obtuvo resultados similares, detectó pérdida de ATRX en el 97% de los astrocitomas con mutación de IDH, sin embargo en los oligodendrogliomas, únicamente 3/16 casos presentaron esta alteración genética [143]. Jiao et al. detectaron mutación del gen de ATRX en el 67% de los astrocitomas grado II y en el 99% de los astrocitomas con alteración de ATRX presentaron además mutación de IDH [139]. Esta distribución muestra claramente que el estatus de ATRX es crucial para diferenciar entre astrocitomas y oligodendrogliomas en los tumores con mutación de IDH.

Estos resultados además, indican que en los tumores astrocitarios se produce un alargamiento alternativo de los telómeros por un mecanismo independiente de la actividad de las telomerasas. En este contexto, se han descrito recientemente mutaciones puntuales en el promotor del gen de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT), frecuentes en los oligodendrogliomas y en los glioblastomas primarios [144, 145].

Se ha visto que las mutaciones de ATRX y TERT son mutuamente excluyentes [145]. Por lo tanto, los gliomas difusos presentan una activación genética del mantenimiento de los telómeros que se puede producir por mutación de ATRX o vía mutación de TERT.

En referencia al valor pronóstico de la pérdida de ATRX, nuestros resultados confirman los obtenidos en estudios previos [119, 141, 146]. Los pacientes con pérdida de expresión de ATRX mostraron mayor mediana de supervivencia global en comparación con aquellos pacientes con ATRX intacto (28 meses frente a 15 meses respectivamente), las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,008$). Sin embargo, en el análisis de los grupos de Abedalthagafi y Nguyen, a pesar de que evidenciaron mayor supervivencia en los pacientes con alteración de ATRX, las diferencias no fueron significativas, probablemente debido a que las series incluyen únicamente gliomas de alto grado y entre estos glioblastomas pediátricos [100, 142]. Por otro lado, dentro de los gliomas difusos con mutación del gen de IDH, se ha visto que la pérdida de ATRX define un grupo de gliomas de peor pronóstico en comparación con aquellos tumores con ATRX intacto y pérdida de 1p19q [119, 147]. En nuestra serie la mediana de supervivencia de los tumores con mutación de IDH1 y ATRX intacto fue de 52 meses frente a 38 meses en los casos con mutación de IDH1 y pérdida de ATRX, con unas diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$).

P53 es uno de los marcadores moleculares más estudiados en los gliomas difusos. En nuestro análisis la detección de p53 positivo por inmunohistoquímica se asoció a los tumores atócitarios con un 57,1% de los casos, se vio en el 25% de los glioblastomas y no se evidenció en los oligodendrogliomas. Numerosos estudios han demostrado la relación de este marcador con los tumores astrocitarios [148, 149]. Sin embargo, la expresión inmunohistoquímica de p53 y su correlación con la mutación del gen es motivo de controversia. En un estudio de comparación entre la inmunohistoquímica y la secuenciación para la detección de las alteraciones de p53, el grupo de Kyritsis afirmó que la primera técnica es un método más preciso cuando el porcentaje de células anómalas es bajo [150]. Marko et al. emplearon también las dos técnicas para detectar alteraciones de p53 en 159 gliomas, detectaron sobreexpresión de la proteína en el 91,8% de los casos con mutación del gen [151], sin embargo, en el análisis multivariado únicamente la mutación del gen, detectada por secuenciación, mostró ser un factor pronóstico independiente. Nuestro análisis confirma que p53 no representa un factor pronóstico en los pacientes con glioma difuso, el estudio de supervivencia no mostró diferencias significativas en función de este marcador inmunohistoquímico. Actualmente, el estudio de la proteína p53 mediante inmunohistoquímica se emplea como un biomarcador diagnóstico en la rutina, teniendo en cuenta que la detección de p53 positivo no implica siempre la mutación del gen [152].

Numerosos estudios han descrito el papel pronóstico de la amplificación del gen de EGFR en los pacientes con gliomas difusos y su asociación con el grado histológico [87, 153, 154]. Ohgaki et al., detectan esta alteración en el 34% de los glioblastomas en una serie de 715 pacientes [112], el grupo de Jarvella, en una serie de 287 gliomas, describe la amplificación del gen en el 4% de los gliomas grado II, en el 21% de los

gliomas grado III y en el 39% de los gliomas grado IV [153]. En nuestra serie, el 33,3% de los glioblastomas presentó amplificación de EGFR, todos los casos eran glioblastomas primarios y no se detectó esta alteración ni en los glioblastomas secundarios ni en los gliomas de bajo grado. En estudios previos se comprobó también la prevalencia de la amplificación de este gen en los glioblastomas primarios frente a los glioblastomas secundarios [153, 155, 156].

Nuestro análisis reveló además que, la supervivencia en los pacientes con amplificación de EGFR es significativamente menor que en los pacientes con EGFR nativo. Sin embargo en el grupo de pacientes con glioblastoma, no evidenciamos una diferencia significativa en la supervivencia en función de la amplificación de EGFR, por lo tanto en nuestra serie EGFR es un factor de mal pronóstico debido a su asociación a los glioblastomas. Resultados similares evidenciaron Jarvella et al. en el caso de los glioblastomas, sin embargo señalan que para los astrocitomas anaplásicos, EGFR representa un factor de mal pronóstico [153], Wrensch y Liu confirman estos hallazgos en el análisis de los astrocitomas anaplásicos de sus series [157, 158].

Por otro lado, los trabajos de Smith, Batchelor y Korshunov indican que el valor pronóstico de la amplificación de EGFR depende de la edad de los pacientes, siendo un factor de buen pronóstico en los pacientes mayores mientras que en los jóvenes esta alteración se asocia a tumores más agresivos [87, 159, 160]. Estos resultados reflejan probablemente las diferentes vías moleculares en la gliomagénesis relacionadas con la edad.

La presencia de EGFRvIII se ha descrito en el 20-30% de los glioblastomas y en el 50-80% de los glioblastomas con amplificación del gen de EGFR [161], en nuestra serie hemos evidenciado esta alteración genética en el 32% de los glioblastomas y en el 45% de los glioblastomas con amplificación del gen. Feldkamp et al. relacionan esta mutación con menor supervivencia en los glioblastomas, sin embargo no demuestran la significación estadística [162], el grupo de Shinojima analiza el valor pronóstico de EGFRvIII en los glioblastomas con amplificación de EGFR y evidencian que de manera significativa la supervivencia es menor en los pacientes que presentan las dos alteraciones [90]. Por el contrario, el análisis de Liu no muestra una asociación entre EGFRvIII y el pronóstico de los pacientes con glioblastoma [158], nuestros hallazgos son similares, las curvas de supervivencia no muestran diferencias en función de la presencia de EGFRvIII.

A lo largo de las dos últimas décadas, la detección de las alteraciones de EGFR en los glioblastomas y otros tumores ha dado lugar al desarrollo de diferentes estrategias terapéuticas frente a esta diana molecular. Entre las cuales están la inmunoterapia pasiva empleando anticuerpos monoclonales frente a EGFR nativo y/o EGFRvIII, radioinmunoterapia, inhibidores de la tirosina quinasa y ligandos de EGFR radiomarcados o conjugados a toxina [163-167]. Para escoger la terapia indicada para cada paciente, habría que tener en cuenta la afinidad y especificidad de la terapia molecular para las células tumorales, por lo tanto el estudio de EGFR requiere analizar

tanto el número de copias del gen como su nivel de expresión y los posibles reordenamientos y mutaciones puntuales que dan lugar a las proteínas y transcritos aberrantes.

La metilación del gen de MGMT se detectó en el 50,9% de los gliomas de nuestra serie y no mostró una asociación significativa con la edad de los pacientes, hallazgos similares se evidenciaron en estudios previos [95, 168]. Reifenberger et al. detectaron esta alteración en el 50,9% de pacientes mayores de 70 años con glioblastoma [97], en nuestra serie, la proporción de metilación en este grupo de edad fue de 56%.

La metilación del promotor del gen del MGMT se ha visto en el 60-80% de los oligodendrogliomas, en el 40-50% de los astrocitomas difusos y anaplásicos y en el 20-45% de los glioblastomas [95, 169, 170]. En nuestra serie los porcentajes fueron similares, el 74% de los oligodendrogliomas, el 52% de los astrocitomas y el 44% de los glioblastomas presentaron la metilación del MGMT.

En cuanto al grado histológico, detectamos la metilación del en el 58% de los gliomas grado II de y el 69% de los gliomas grado III de nuestra serie, en el estudio de Mellai y en concordancia con nuestros resultados, evidenciaron esta alteración en el 53% de los gliomas grado II y en el 64% de los gliomas grado III [95].

Los trabajos de Sanson y Mellai señalan una asociación significativa entre la metilación del gen de MGMT y la mutación de IDH [94, 95], en el primer trabajo evidencian además que la codeleción de 1p19q se presenta con mayor frecuencia en los tumores metilados con unas diferencias estadísticamente significativas. Nuestro análisis confirma estos resultados, la mutación de IDH1 y la codeleción 1p19q fueron más frecuentes en los gliomas con metilación de MGMT en comparación con los tumores no metilados ($p=0,024$ y $p=0,037$ respectivamente).

Numerosos estudios se han enfocado en el análisis del papel pronóstico y predictivo de la metilación de MGMT en los gliomas difusos. Un meta-análisis que incluye 20 estudios con 2018 pacientes en total, mostró que el silenciamiento del gen de MGMT se asocia a mayor supervivencia en aquellos pacientes que reciben tratamiento por glioma de alto grado [171]. Además, indicó que el beneficio es evidente en todos los grupos de tratamiento (quimio-radioterapia, quimioterapia y radioterapia) y tanto en los pacientes tratados por tumor primario como por recurrencia [171].

Según este meta-análisis, la metilación del MGMT es un factor predictivo y no pronóstico debido a que observó un incremento del riesgo de muerte, determinado por Hazard Ratio, en el grupo de pacientes tratados únicamente con cirugía en comparación con aquellos tratados con terapia adyuvante [171].

Nuestros resultados concuerdan con estos hallazgos, el estudio de supervivencia independientemente de otros factores no mostró diferencias significativas en función de la metilación de MGMT, sin embargo se evidenció mayor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en los pacientes con metilación tratados con terapia adyuvante que en los pacientes sin metilación del gen ($p<0,001$).

En los estudios NOA-04, EORTC26951, los autores afirman que MGMT es un factor pronóstico además de predictivo de tratamiento con agentes alquilantes, señalan que en el grupo de pacientes tratados únicamente con radioterapia presentan diferencias significativas en la supervivencia en función de la metilación [28, 172]. Resultados similares se objetivaron en un análisis de 225 glioblastomas [173]. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la alquilación del DNA en la posición O6 de la guanina es uno de los mecanismos mediante los cuales actúa también la radioterapia. Además, se ha demostrado que la actividad de MGMT se relaciona con resistencia en líneas celulares de glioma y xenoinjertos de glioma humano tratados con radiación ionizante [174].

Nuestro análisis reveló una correlación del 53,6% en el estado de MGMT entre la primera y segunda cirugía. Además el cambio del estado del gen fue más frecuente en los gliomas no metilados en comparación con los metilados (59% y 27% respectivamente). En el estudio de Brandes et al. también evidencian una baja correlación en el estado del gen entre el tumor primario y la recidiva (63%), sin embargo el cambio del estatus fue más frecuente en los gliomas metilados [98]. La caracterización molecular de los glioblastomas (Cancer Atlas Research Network) reveló una asociación entre el estado de metilación del promotor de MGMT y un fenotipo hipermutado después del tratamiento con agentes alquilantes. Este fenotipo se debe a la acumulación de mutaciones en las áreas no-CpG durante el tratamiento de los glioblastomas metilados, estas mutaciones implican genes reparadores que a su vez no pueden ser reparados por MGMT [70]. Olar et al. relacionan este fenotipo hipermutado con el cambio de metilación observado en algunos gliomas tratados [74].

La actividad proliferativa es un indicador de la biología y del comportamiento del tumor. Ki67 es uno de los marcadores más empleados en la práctica clínica para medir la proliferación tumoral. Estudios antiguos y recientes ponen de manifiesto el valor pronóstico de Ki67/MIB-1 y su asociación al grado histológico en los gliomas difusos [63, 64].

En nuestra serie se evidenció un incremento significativo de Ki67 asociado a un aumento del grado histológico. Sin embargo, nuestro estudio multivariado, este marcador no supuso un factor pronóstico independiente en los pacientes con glioma, resultados similares señalan Preusser et al. en su estudio de una amplia serie de oligodendrogliomas anaplásicos [175].

Un alto valor de Ki67 es indicativo de mayor agresividad tumoral y en estos casos, generalmente las terapias empleadas son más agresivas. Sin embargo no se ha visto una clara asociación entre este marcador y la respuesta al tratamiento y numerosos estudios señalan que no existen datos suficientes para apoyar un valor predictivo del índice de proliferación Ki67 en los gliomas difusos [176, 177].

Recientemente, se ha descrito la importancia de PHH3 (Fosfohistona 3) como marcador de proliferación tumoral en los gliomas difusos, se ha visto que el análisis de este biomarcador es más fiable y sensible para la detección de figuras de mitosis [74,

77]. Algunos estudios ponen de manifiesto su valor pronóstico, especialmente en los gliomas difusos grado histológico II-III [178, 179].

Los primeros trabajos de expresión génica en los gliomas difusos, realizados principalmente en glioblastomas, se realizaron con el fin de establecer correlaciones moleculares con entidades clínicas y/o histopatológicas conocidas como el grado de la OMS, astrocitomas frente a oligodendrogliomas y glioblastomas primarios frente a glioblastomas secundarios [180-188]. Los estudios posteriores se enfocaron más en la identificación de distinciones moleculares naturales dentro de los gliomas difusos y, a pesar de algunas diferencias, han puesto de manifiesto subclases bien definidas dentro del grupo de glioblastoma. El primero de estos estudios analizó genes pronósticos relevantes en los gliomas grado III y IV y reveló 3 subtipos principales denominados: proneural, mesenquimal y proliferativo [104]. Seguido del trabajo del TCGA en el que se definieron 4 subtipos moleculares denominados: proneural, neural, clásico y mesenquimal [70].

Se han descrito numerosas alteraciones genéticas asociadas a estos subtipos. El descubrimiento de la mutación del gen de IDH supuso un cambio en el paradigma del entendimiento y la clasificación de los tumores gliales. La determinación de esta alteración genética permite definir 2 grupos moleculares principales, a su vez divididos en subtipos adicionales en función de otras alteraciones genéticas (Figura V.1).

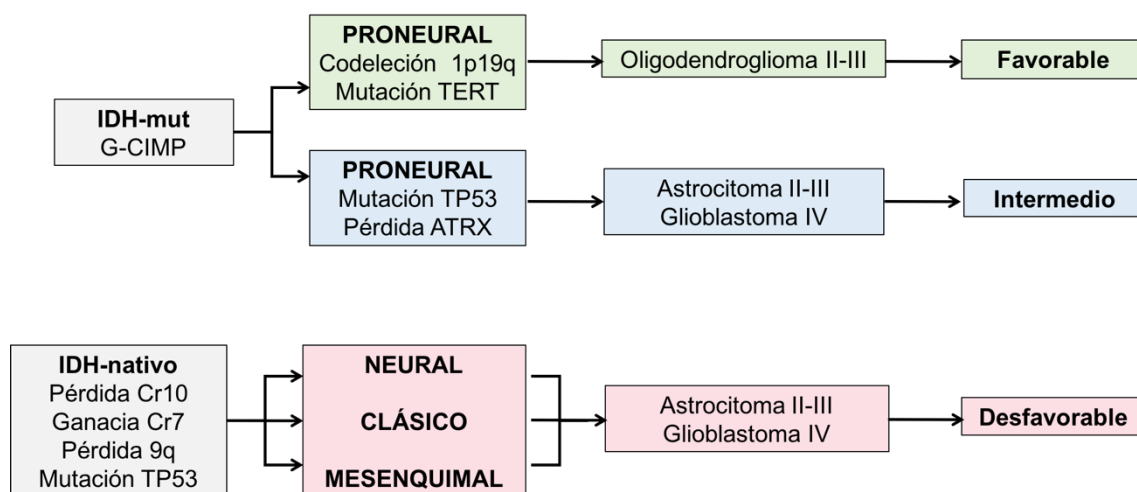


Figura V.1. Gliomas difusos, subtipos moleculares pronósticos. Mut: mutado. Cr: Cromosoma. Modificado de Huse et al. 2015 [103].

En nuestro estudio se confirman estos hallazgos, la mutación del gen de IDH1 define dos grupos moleculares pronósticos:

El primer grupo, con mutación del gen de IDH1, con un pronóstico más favorable, formado principalmente por pacientes jóvenes, este grupo incluye astrocitomas, oligodendrogliomas y glioblastomas secundarios. El segundo grupo, con IDH1 nativo,

en el que predominan los pacientes mayores y los glioblastomas primarios, representa el grupo de peor pronóstico, las diferencias en la supervivencia de ambos grupos fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

Sahm et al. evaluaron 43 gliomas mixtos en los cuales analizaron la mutación de IDH, la codeleción 1p19q y la pérdida de ATRX y en 31/43 casos detectaron únicamente alteraciones características de los oligodendrogliomas y 11/43 casos presentaron exclusivamente las mutaciones típicas en los astrocitomas. El caso restante mostró alteraciones comunes a ambos tipos histológicos, sin embargo, este se correspondió al único paciente que recibió radioterapia previa a la cirugía, siendo probablemente la causa de este patrón aberrante [189]. Nuestros resultados fueron similares, en el grupo con mutación de IDH1, la delección 1p19q y la pérdida de ATRX fueron mutuamente excluyentes y no se detectaron casos con ambas alteraciones. Estos resultados proporcionan evidencias en contra de la existencia de los gliomas mixtos como entidad independiente. En la reciente y actual clasificación de la OMS, el diagnóstico de oligoastrocitoma se mantiene en los casos en los que no se puedan realizar estudios moleculares. Por lo tanto, el diagnóstico de los gliomas difusos basado en estos marcadores moleculares sería según el siguiente esquema (Figura V.2).

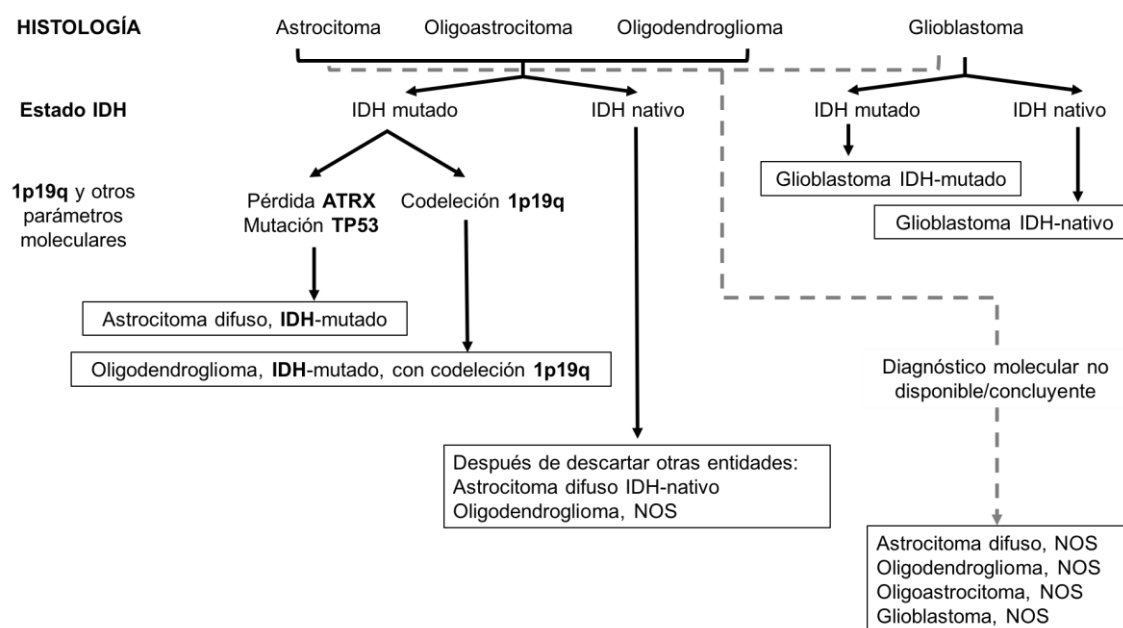


Figura V.2. Algoritmo diagnóstico para los gliomas difusos basado en los hallazgos histológicos y genéticos. Modificado de Louis et al. 2016[1].

Numerosos estudios se han enfocado en la redefinición de la clasificación de los gliomas difusos de la OMS del año 2007 con el fin de incorporar los estudios moleculares [119, 141, 143, 146, 147, 190]. Jiao et al. clasificaron sus casos en 3 grupos moleculares en función de IDH, ATRX, CIC y FUBP1: el grupo I-CF (IDH/CIC/FUBP1), el

grupo I-A (IDH/ATRX) y el grupo I-X (resto de casos), sus resultados señalaron que la supervivencia fue mayor en los pacientes con gliomas del grupo I-CF, seguidos de los pacientes del grupo I-A y por último los pertenecientes al grupo I-X, las medianas de supervivencia global fueron de 96, 51 y 13 meses respectivamente [147]. El grupo de Mur [119] en cambio empleó la codeleción 1p19q y la sobreexpresión de p53 junto con la pérdida de ATRX y la mutación de IDH para clasificar los gliomas en 4 grupos pronósticos, en el primer grupo (I-CD) incluyeron aquellos gliomas con mutación de IDH, codeleción 1p19q y ATRX intacto, la supervivencia media de estos pacientes fue de 179,5 meses. En el segundo grupo (I-A) con mutación de IDH, pérdida de ATRX y sobreexpresión de p53, la supervivencia fue de 118 meses. Los pacientes del tercer grupo (I), únicamente con mutación de IDH, presentaron una supervivencia de 82,7 meses y por último, el grupo NA sin alteración de IDH, ATRX o 1p19q, fue el de peor pronóstico con una media de supervivencia de 10,7 meses. A diferencia del estudio previo, en este trabajo se detectó un nuevo grupo (I) dentro de los gliomas con IDH mutado y que, de manera significativa, se asoció a peor pronóstico. En nuestro trabajo determinamos 3 grupos moleculares en función de la mutación de IDH1, codeleción 1p19q y pérdida de ATRX. El Primer grupo con mutación de IDH1 y codeleción 1p19q, mostró un pronóstico más favorable, el segundo grupo con mutación de IDH1 y pérdida de ATRX con un pronóstico intermedio y el último grupo con IDH1 nativo que representó el grupo de peor pronóstico. Las diferencias en la supervivencia entre los distintos subtipos moleculares fueron estadísticamente significativas.

Los trabajos realizados en los últimos años incluyendo este presente han demostrado la necesidad de redefinir la clasificación de los gliomas difusos del año 2007. En el consenso de Haarlem de 2014, con el fin de integrar los datos histológicos y moleculares, los autores propusieron para los gliomas difusos grado II-III un algoritmo diagnóstico en el que incluyeron además del diagnóstico histológico, la determinación de la mutación del gen de IDH, la codeleción 1p19q y la pérdida de ATRX (Tabla V.1) [191].

	ASTROCITOMA DIFUSO	OLIGODENDROGLIOMA	OLIGOASTROCITOMA O HISTOLOGÍA AMBIGUA
IDH-mut, 1p/19q no codel, pérdida ATRX	<i>Astrocitoma difuso, pérdida de expresión de ATRX</i>	<i>Glioma difuso (fenotipo oligo), no delección 1p/19q, pérdida de expresión de ATRX</i>	<i>Astrocitoma difuso, pérdida de expresión de ATRX</i>
IDH-mut, 1p/19q codel, ATRX intacto	<i>Glioma difuso (fenotipo astro), codeleción 1p/19q</i>	<i>Oligodendroglioma, codeleción 1p/19q</i>	<i>Oligodendroglioma, codeleción 1p/19q</i>
IDH nativo	<i>Astrocitoma difuso, IDH nativo</i>	<i>Glioma difuso (fenotipo oligo), IDH nativo</i>	<i>Astrocitoma difuso, IDH nativo</i>
Sin estudio molecular	<i>Astrocitoma difuso, NOS</i>	<i>Oligodendroglioma, NOS</i>	<i>Glioma difuso, NOS</i>

Tabla V.1. Ejemplo de diagnóstico integrado molecular en gliomas grado II-III. Oligo: oligodendroglioma, astro: astrocitoma, NOS: not otherwise specified. Modificado de Louis et al. Consenso Haarlem 2014 [191].

Este consenso conllevó a la publicación de la actual clasificación de la OMS en mayo del 2016 en la cual la clasificación de los gliomas difusos es la siguiente (Tabla V.2):

Astrocitomas y oligodendrogliomas difusos

Astrocitoma difuso IDH-mutado

Astrocitoma difuso IDH-nativo

Astrocitoma difuso, NOS

Astrocitoma anaplásico IDH-mutado

Astrocitoma anaplásico IDH-nativo

Astrocitoma anaplásico, NOS

Glioblastoma IDH-nativo

Glioblastoma IDH-mutado

Glioblastoma, NOS

Glioma difuso de la línea media, H3 K27M-mutado

Oligodendroglioma, IDH-mutado y con codeleción 1p19q

Oligodendroglioma, NOS

Oligodendroglioma anaplásico, IDH-mutado y con codeleción 1p19q

Oligodendroglioma anaplásico, NOS

Oligoastrocitoma, NOS

Oligoastrocitoma anaplásico, NOS

Tabla V.2. Clasificación de la OMS 2016 de los gliomas difusos. Modificado de Louis D.N. et al. [1].

Actualmente no hay diferencias significativas en el tratamiento de los pacientes con gliomas difusos basado en diferenciación astrocitaria u oligodendroglioma o en función de los marcadores moleculares pronósticos. Las decisiones de tratamiento se basan fundamentalmente en el grado histológico de la OMS a pesar de que el pronóstico puede variar significativamente dentro de un mismo subgrupo. Con el desarrollo de las terapias personalizadas para los pacientes con glioma, una incorporación de las firmas genéticas a las guías de tratamiento sería vital para el manejo de estos pacientes.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. En el análisis multivariante se ha demostrado que el subtipo molecular, junto con la edad y la cirugía son los factores pronósticos más relevantes en el estudio de los pacientes con gliomas difusos.
2. En nuestra serie, los factores clásicos como el diagnóstico histológico y la proliferación tumoral, determinada por Ki67, se asocian al pronóstico de los pacientes con gliomas difusos.
3. La mutación del gen de IDH1 permite distinguir 2 subtipos moleculares principales con características clínicas, histológicas y moleculares diferentes.
4. Se ha constatado que la codeleción 1p19q es un factor de buen pronóstico en los gliomas difusos y un marcador diagnóstico asociado a los oligodendrogliomas.
5. La pérdida de expresión de ATRX se ha asociado a los astrocitomas difusos y anaplásicos y a los glioblastomas secundarios, se ha demostrado además que es un factor de buen pronóstico en los gliomas difusos.
6. La detección de p53 positivo por inmunohistoquímica es un factor diagnóstico asociado a los astrocitomas y a los glioblastomas secundarios. Sin embargo, no se ha asociado al pronóstico de los pacientes con gliomas difusos.
7. El estado del gen de IDH1, de los cromosomas 1p/19q y de la proteína ATRX se mantiene estable en los distintos grados histológicos.
8. La determinación de la codeleción 1p19q, la pérdida de expresión de ATRX en los gliomas con mutación de IDH1 permite identificar subgrupos diagnósticos con diferenciación astrocitaria y oligodendroglioma.
9. El análisis de la mutación de IDH1, la codeleción 1p19q y la pérdida de ATRX determina subgrupos moleculares pronósticos con mayor significancia estadística que los grupos determinados por el grado histológico.
10. El análisis de la metilación del promotor del gen de MGMT ha demostrado que es un factor predictivo de respuesta a terapia adyuvante. Aunque no se ha constatado su valor pronóstico en nuestra serie.
11. Cerca del 50% de los pacientes con recidiva ha presentado un cambio del estado de metilación de MGMT entre la primera y segunda biopsia.
12. La amplificación del gen de EGFR y EGFRvIII suponen factores de mal pronóstico en los pacientes con gliomas difusos debido a su asociación a los glioblastomas primarios. Sin embargo, no se han evidenciado diferencias en la supervivencia de los pacientes con glioblastoma en función de estas alteraciones.

RESUMEN

Los gliomas difusos son la neoplasia primaria cerebral más frecuente, representan el 32% de todos los tumores cerebrales y del sistema nervioso central el 80% de los gliomas malignos primarios, más de la mitad son glioblastomas cuya supervivencia global a los 5 años no supera el 5%.

Este trabajo se ha desarrollado con el fin de estudiar los factores pronósticos clínicos, histológicos y moleculares implicados en la evolución de los pacientes con gliomas difusos y demostrar, en concordancia con la última clasificación de la OMS de 2016, la importancia de la inclusión del estudio molecular en la actividad asistencial para establecer un diagnóstico más preciso, además de aportar información sobre el pronóstico y el tratamiento de estos pacientes.

Se realizó un estudio retrospectivo de un total de 138 muestras de gliomas difusos diagnosticados en nuestro departamento entre los años 1991 y 2014, pertenecientes a 108 pacientes adultos con seguimiento clínico.

La caracterización molecular se determinó mediante el análisis de la mutación de IDH1, codeleción 1p19q, expresión de p53, pérdida de ATRX, amplificación de EGFR, detección de EGFRvIII, metilación de MGMT e índice de proliferación (Ki67).

Los resultados confirmaron el valor diagnóstico de la mutación de IDH1 que se asoció los grados II y III (87,5% y 56,3 respectivamente) estando prácticamente ausente en el glioblastoma (4,4%). Igualmente, la codeleción de 1p/19q fue exclusiva de los tumores oligodendrogiales, los cuales en su mayoría también presentaron la mutación del gen IDH1 (89,5%), mientras que la pérdida ATRX y la sobreexpresión de p53 se observaron en los tumores astrocitarios (84,2% y 57,1%).

Mediante el análisis de supervivencia se demostró el valor pronóstico de la mutación de IDH1 ($p<0,001$), codeleción 1p19q ($p<0,001$) y pérdida de ATRX ($P=0,009$). La amplificación de EGFR supuso un factor de mal pronóstico ($p<0,001$) y la metilación de MGMT se asoció a una mejor respuesta al tratamiento adyuvante en los pacientes sometidos a cirugía ($p<0,001$).

La asociación entre las alteraciones moleculares determinó 3 subgrupos moleculares. Un grupo con mutación de IDH1 y codeleción 1p19q con mejor pronóstico, un grupo con pronóstico intermedio con mutación de IDH1 y pérdida de ATRX y 1p19q intacto y el último grupo con mal pronóstico con IDH1 nativo.

El análisis de regresión de Cox para definir los riesgos relativos del grado histológico y de la clasificación molecular sugirió una superioridad en esta última para identificar subgrupos de pacientes con pronósticos diferenciales.

Por último, en el análisis multivariado, la edad, el subtipo molecular y la cirugía se asociaron significativamente a la supervivencia global.

Los resultados concluyen que un diagnóstico integrado permite un mejor conocimiento de los grupos pronósticos y biológicos de los gliomas difusos favoreciendo una aproximación más personalizada al tratamiento de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 803-20.
2. Perry, A. and D.J. Brat, eds. *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach*. Practical Surgical Neuropathology, ed. K.O.L.a.M.R. Wick. 2010, Churchill Livingstone. Elsevier.: Philadelphia. 620.
3. Bailey, P. and H. Cushing, *A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis*. 1926, JB Lippincott: Philadelphia.
4. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011*. Neuro Oncol, 2014. **16 Suppl 4**: p. iv1-63.
5. Chang, S.M., et al., *Patterns of care for adults with newly diagnosed malignant glioma*. JAMA, 2005. **293**(5): p. 557-64.
6. Chandana, S.R., et al., *Primary brain tumors in adults*. Am Fam Physician, 2008. **77**(10): p. 1423-30.
7. Schneider, T., et al., *Gliomas in adults*. Dtsch Arztebl Int, 2010. **107**(45): p. 799-807; quiz 808.
8. Jacobs, A.H., et al., *Imaging in neurooncology*. NeuroRx, 2005. **2**(2): p. 333-47.
9. Debnam, J.M. and D. Schellingerhout, *Diffusion MR Imaging of the Brain in Patients with Cancer*. International Journal of Molecular Imaging, 2011. **2011**.
10. Cha, S., *Update on brain tumor imaging: from anatomy to physiology*. AJNR Am J Neuroradiol, 2006. **27**(3): p. 475-87.
11. Horska, A. and P.B. Barker, *Imaging of brain tumors: MR spectroscopy and metabolic imaging*. Neuroimaging Clin N Am, 2010. **20**(3): p. 293-310.
12. Keunen, O., et al., *Multimodal imaging of gliomas in the context of evolving cellular and molecular therapies*. Adv Drug Deliv Rev, 2014. **76**: p. 98-115.
13. Chiang, S., *Follow up imaging: molecular imaging is likely best as a single modality, but multimodality imaging is the future*. Frontiers in Neurology, 2015. **6**.
14. Pang, B.C., et al., *The role of surgery in high-grade glioma--is surgical resection justified? A review of the current knowledge*. Ann Acad Med Singapore, 2007. **36**(5): p. 358-63.
15. Almeida, J.P., et al., *The value of extent of resection of glioblastomas: clinical evidence and current approach*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2015. **15**(2): p. 517.
16. McGirt, M.J., et al., *Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma*. J Neurosurg, 2009. **110**(1): p. 156-62.
17. Jackson, R.J., et al., *Limitations of stereotactic biopsy in the initial management of gliomas*. Neuro Oncol, 2001. **3**(3): p. 193-200.
18. Weller, M., et al., *EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma*. Lancet Oncol, 2014. **15**(9): p. e395-403.
19. Walker, M.D., et al., *Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial*. J Neurosurg, 1978. **49**(3): p. 333-43.
20. Walker, M.D., et al., *Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery*. N Engl J Med, 1980. **303**(23): p. 1323-9.
21. Karim, A.B., et al., *A randomized trial on dose-response in radiation therapy of low-grade cerebral glioma: European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Study 22844*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996. **36**(3): p. 549-56.
22. Forst, D.A., et al., *Low-Grade Gliomas*. The Oncologist, 2014. **19**(4): p. 403-413.

23. van den Bent, M.J., T.J. Snijders, and J.E. Bromberg, *Current treatment of low grade gliomas*. Memo, 2012. **5**(3): p. 223-227.
24. Stupp, R., et al., *High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Annals of Oncology, 2014.
25. Keime-Guibert, F., et al., *Radiotherapy for glioblastoma in the elderly*. N Engl J Med, 2007. **356**(15): p. 1527-35.
26. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
27. Le Rhun, E., S. Taillibert, and M.C. Chamberlain, *The future of high-grade glioma: Where we are and where are we going*. Surg Neurol Int, 2015. **6**(Suppl 1): p. S9-S44.
28. Wick, W., et al., *NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide*. J Clin Oncol, 2009. **27**(35): p. 5874-80.
29. Shaw, E.G., et al., *Randomized trial of radiation therapy plus procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy for supratentorial adult low-grade glioma: initial results of RTOG 9802*. J Clin Oncol, 2012. **30**(25): p. 3065-70.
30. Buckner, J.C., et al., *Phase III study of radiation therapy (RT) with or without procarbazine, CCNU, and vincristine (PCV) in low-grade glioma: RTOG 9802 with Alliance, ECOG, and SWOG*. J Clin Oncol, 2014. **32**(suppl 5s):abstr 2000.
31. Kaloshi, G., et al., *Temozolomide for low-grade gliomas: predictive impact of 1p/19q loss on response and outcome*. Neurology, 2007. **68**(21): p. 1831-6.
32. Cairncross, G., et al., *Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402*. J Clin Oncol, 2013. **31**(3): p. 337-43.
33. Taal, W., et al., *Treatment of large low-grade oligodendroglial tumors with upfront procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy with long follow-up: a retrospective cohort study with growth kinetics*. J Neurooncol, 2015. **121**(2): p. 365-72.
34. Westphal, M., et al., *A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma*. Neuro Oncol, 2003. **5**(2): p. 79-88.
35. Gilbert, M.R., et al., *A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma*. New England Journal of Medicine, 2014. **370**(8): p. 699-708.
36. Chinot, O.L., et al., *Bevacizumab plus Radiotherapy-Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma*. New England Journal of Medicine, 2014. **370**(8): p. 709-722.
37. Herrlinger, U., et al., *O10.04THE RANDOMIZED, MULTICENTER GLARIUS TRIAL INVESTIGATING BEVACIZUMAB/IRINOTECAN VS STANDARD TEMOZOLOMIDE IN NEWLY DIAGNOSED, MGMT-NON-METHYLATED GLIOBLASTOMA PATIENTS: FINAL SURVIVAL RESULTS AND QUALITY OF LIFE*. Neuro-Oncology, 2014. **16**(Suppl 2): p. ii23-ii24.
38. MB, S., *Contrary to nature*. 1977, Washington, DC: US Department of Health, Education and Welfare.
39. Kernohan, J.W., R.F. Mabon, and et al., *A simplified classification of the gliomas*. Proc Staff Meet Mayo Clin, 1949. **24**(3): p. 71-5.
40. Ringertz, N., *»GRADING« OF GLIOMAS*. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica, 1950. **27**(1): p. 51-64.
41. Zülch, K.J., ed. *Histological typing of tumours of the central nervous system*. World Health Organization, Geneva. 1979.
42. Kleihues, P., P.C. Burger, and B.W. Scheithauer, eds. *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System*. WHO. World Health Organization. International Histological Classification of Tumours. 1993, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Heidelberg.
43. P, K. and C. WK, eds. *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*. World Health Organization classification of tumours. 2000, Lyon, France: IARC Press: Lyon.
44. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
45. Shaw, E.G., B.W. Scheithauer, and J.R. O'Fallon, *Supratentorial gliomas: a comparative study by grade and histologic type*. J Neurooncol, 1997. **31**(3): p. 273-8.

46. Winger, M.J., D.R. Macdonald, and J.G. Cairncross, *Supratentorial anaplastic gliomas in adults. The prognostic importance of extent of resection and prior low-grade glioma.* J Neurosurg, 1989. **71**(4): p. 487-93.
47. Miller, C.R., et al., *Significance of necrosis in grading of oligodendroglial neoplasms: a clinicopathologic and genetic study of newly diagnosed high-grade gliomas.* J Clin Oncol, 2006. **24**(34): p. 5419-26.
48. Tortosa, A., et al., *Prognostic implication of clinical, radiologic, and pathologic features in patients with anaplastic gliomas.* Cancer, 2003. **97**(4): p. 1063-1071.
49. Mason, W.P., G.S. Krol, and L.M. DeAngelis, *Low-grade oligodendroglioma responds to chemotherapy.* Neurology, 1996. **46**(1): p. 203-7.
50. Shaw, E., et al., *Prospective randomized trial of low- versus high-dose radiation therapy in adults with supratentorial low-grade glioma: initial report of a North Central Cancer Treatment Group/Radiation Therapy Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group study.* J Clin Oncol, 2002. **20**(9): p. 2267-76.
51. Jeremic, B., et al., *Combined treatment modality for anaplastic oligodendroglioma and oligoastrocytoma: a 10-year update of a phase II study.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **59**(2): p. 509-14.
52. Kim, L., et al., *Procarbazine, lomustine, and vincristine (PCV) chemotherapy for grade III and grade IV oligoastrocytomas.* J Neurosurg, 1996. **85**(4): p. 602-7.
53. Park, C.K., et al., *Recursive partitioning analysis of prognostic factors in WHO grade III glioma patients treated with radiotherapy or radiotherapy plus chemotherapy.* BMC Cancer, 2009. **9**: p. 450.
54. Kros, J.M., et al., *Panel review of anaplastic oligodendroglioma from European Organization For Research and Treatment of Cancer Trial 26951: assessment of consensus in diagnosis, influence of 1p/19q loss, and correlations with outcome.* J Neuropathol Exp Neurol, 2007. **66**(6): p. 545-51.
55. Smith, J.S., et al., *Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas.* J Clin Oncol, 2000. **18**(3): p. 636-45.
56. Daumas-Duport, C., et al., *Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method.* Cancer, 1988. **62**(10): p. 2152-65.
57. Louis, D.N., et al., eds. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Fourth Edition.* Lyon, ed. M.D. Fred T. Bosman, et al. 2007, International Agency for Research on Cancer (IARC) 69008 Lyon, France.
58. Aldape, K., et al., *Discrepancies in diagnoses of neuroepithelial neoplasms.* Cancer, 2000. **88**(10): p. 2342-2349.
59. Bruner, J.M., et al., *Diagnostic discrepancies and their clinical impact in a neuropathology referral practice.* Cancer, 1997. **79**(4): p. 796-803.
60. van den Bent, M.J., *Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective.* Acta Neuropathologica, 2010. **120**(3): p. 297-304.
61. Giannini, C., et al., *Cellular proliferation in pilocytic and diffuse astrocytomas.* J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(1): p. 46-53.
62. Giannini, C., et al., *Oligodendrogliomas: reproducibility and prognostic value of histologic diagnosis and grading.* J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(3): p. 248-62.
63. Johannessen, A.L. and S.H. Torp, *The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas.* Pathol Oncol Res, 2006. **12**(3): p. 143-7.
64. Chen, W.J., et al., *Ki-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: evidence from a systematic review and meta-analysis.* Asian Pac J Cancer Prev, 2015. **16**(2): p. 411-20.
65. Moll, U.M. and O. Petrenko, *The MDM2-p53 interaction.* Mol Cancer Res, 2003. **1**(14): p. 1001-8.
66. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas.* Cancer Sci, 2009. **100**(12): p. 2235-41.
67. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma.* The American Journal of Pathology, 2007. **170**(5): p. 1445-1453.

68. Watanabe, T., et al., *Concurrent inactivation of RB1 and TP53 pathways in anaplastic oligodendrogliomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(12): p. 1181-9.
69. Knudsen, E.S. and J.Y. Wang, *Targeting the RB-pathway in cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(4): p. 1094-9.
70. Network., C.G.A.R., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061-8.
71. Nazarenko, I., et al., *PDGF and PDGF receptors in glioma*. Upsala Journal of Medical Sciences, 2012. **117**(2): p. 99-112.
72. Wiencke, J.K., et al., *Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma*. Neuro-Oncology, 2007. **9**(3): p. 271-279.
73. Cohen, A.L., S.L. Holmen, and H. Colman, *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2013. **13**(5): p. 345.
74. Olar, A. and K.D. Aldape, *Biomarkers classification and therapeutic decision-making for malignant gliomas*. Curr Treat Options Oncol, 2012. **13**(4): p. 417-36.
75. Parsons, D.W., et al., *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1807-12.
76. Hartmann, C., et al., *Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(6): p. 707-18.
77. Olar, A., et al., *IDH mutation status and role of WHO grade and mitotic index in overall survival in grade II-III diffuse gliomas*. Acta Neuropathol, 2015. **129**(4): p. 585-96.
78. Cairncross, J.G., et al., *Benefit from procarbazine, lomustine, and vincristine in oligodendroglial tumors is associated with mutation of IDH*. J Clin Oncol, 2014. **32**(8): p. 783-90.
79. Fallon, K.B., et al., *Prognostic value of 1p, 19q, 9p, 10q, and EGFR-FISH analyses in recurrent oligodendrogliomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2004. **63**(4): p. 314-22.
80. Jenkins, R.B., et al., *A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma*. Cancer Res, 2006. **66**(20): p. 9852-61.
81. Vigneswaran, K., S. Neill, and C.G. Hadjipanayis, *Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification*. Annals of Translational Medicine, 2015. **3**(7): p. 95.
82. Kim, Y.H., et al., *Molecular classification of low-grade diffuse gliomas*. Am J Pathol, 2010. **177**(6): p. 2708-14.
83. Nyati, M.K., et al., *Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 876-885.
84. Olar, A. and K.D. Aldape, *Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment*. J Pathol, 2014. **232**(2): p. 165-77.
85. Salkeni, M.A., et al., *Detection of EGFRvIII mutant DNA in the peripheral blood of brain tumor patients*. J Neurooncol, 2013. **115**(1): p. 27-35.
86. Soeda, A., et al., *Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(16): p. 10958-66.
87. Smith, J.S., et al., *PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(16): p. 1246-56.
88. Houillier, C., et al., *Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas*. Cancer, 2006. **106**(10): p. 2218-23.
89. Simmons, M.L., et al., *Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients*. Cancer Res, 2001. **61**(3): p. 1122-8.
90. Shinojima, N., et al., *Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme*. Cancer Res, 2003. **63**(20): p. 6962-70.

91. Benito, R., et al., *Primary glioblastomas with and without EGFR amplification: relationship to genetic alterations and clinicopathological features*. Neuropathology, 2010. **30**(4): p. 392-400.
92. Hobbs, J., et al., *Paradoxical relationship between the degree of EGFR amplification and outcome in glioblastomas*. Am J Surg Pathol, 2012. **36**(8): p. 1186-93.
93. Hegi, M.E., et al., *Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity*. J Clin Oncol, 2008. **26**(25): p. 4189-99.
94. Sanson, M., et al., *Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas*. J Clin Oncol, 2009. **27**(25): p. 4150-4.
95. Mellai, M., et al., *MGMT promoter hypermethylation and its associations with genetic alterations in a series of 350 brain tumors*. J Neurooncol, 2012. **107**(3): p. 617-31.
96. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
97. Reifenberger, G., et al., *Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly*. Int J Cancer, 2012. **131**(6): p. 1342-50.
98. Brandes, A.A., et al., *O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase methylation status can change between first surgery for newly diagnosed glioblastoma and second surgery for recurrence: clinical implications*. Neuro Oncol, 2010. **12**(3): p. 283-8.
99. Hygino da Cruz, L.C., Jr., et al., *Pseudoprogression and pseudoresponse: imaging challenges in the assessment of posttreatment glioma*. AJNR Am J Neuroradiol, 2011. **32**(11): p. 1978-85.
100. Nguyen, D.N., et al., *Molecular and morphologic correlates of the alternative lengthening of telomeres phenotype in high-grade astrocytomas*. Brain Pathol, 2013. **23**(3): p. 237-43.
101. Heaphy, C.M., et al., *Prevalence of the alternative lengthening of telomeres telomere maintenance mechanism in human cancer subtypes*. Am J Pathol, 2011. **179**(4): p. 1608-15.
102. McDonald, K.L., et al., *Presence of alternative lengthening of telomeres mechanism in patients with glioblastoma identifies a less aggressive tumor type with longer survival*. J Neuropathol Exp Neurol, 2010. **69**(7): p. 729-36.
103. Huse, J.T. and K.D. Aldape, *The evolving role of molecular markers in the diagnosis and management of diffuse glioma*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(22): p. 5601-11.
104. Verhaak, R.G.W., et al., *An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1*. Cancer cell, 2010. **17**(1): p. 98.
105. Woehrer, A., et al., *FISH-based detection of 1p 19q codeletion in oligodendroglial tumors: procedures and protocols for neuropathological practice - a publication under the auspices of the Research Committee of the European Confederation of Neuropathological Societies (Euro-CNS)*. Clin Neuropathol, 2011. **30**(2): p. 47-55.
106. Layfield, L.J., et al., *Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein expression in glioblastoma multiforme: prognostic significance and relationship to other prognostic factors*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2006. **14**(1): p. 91-6.
107. Burger, P.C. and S.B. Green, *Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme*. Cancer, 1987. **59**(9): p. 1617-25.
108. Kim, T.S., et al., *Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas*. J Neurosurg, 1991. **74**(1): p. 27-37.
109. Rasheed, B.K., et al., *Alterations of the TP53 gene in human gliomas*. Cancer Res, 1994. **54**(5): p. 1324-30.
110. Sneed, P.K., et al., *Large effect of age on the survival of patients with glioblastoma treated with radiotherapy and brachytherapy boost*. Neurosurgery, 1995. **36**(5): p. 898-903; discussion 903-4.
111. Salmon, I., et al., *Prognostic scoring in adult astrocytic tumors using patient age, histopathological grade, and DNA histogram type*. J Neurosurg, 1994. **80**(5): p. 877-83.
112. Ohgaki, H., et al., *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6892-9.

113. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2005. **64**(6): p. 479-89.
114. Watanabe, T., et al., *IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas*. Am J Pathol, 2009. **174**(4): p. 1149-53.
115. Nobusawa, S., et al., *IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(19): p. 6002-7.
116. Sonoda, Y., et al., *Analysis of IDH1 and IDH2 mutations in Japanese glioma patients*. Cancer Sci, 2009. **100**(10): p. 1996-8.
117. Balss, J., et al., *Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors*. Acta Neuropathol, 2008. **116**(6): p. 597-602.
118. Ichimura, K., et al., *IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas*. Neuro Oncol, 2009. **11**(4): p. 341-7.
119. Mur, P., et al., *Molecular classification defines 4 prognostically distinct glioma groups irrespective of diagnosis and grade*. J Neuropathol Exp Neurol, 2015. **74**(3): p. 241-9.
120. Xia, L., et al., *Prognostic role of IDH mutations in gliomas: a meta-analysis of 55 observational studies*. Oncotarget, 2015. **6**(19): p. 17354-65.
121. Wang, X.W., et al., *IDH mutations: genotype-phenotype correlation and prognostic impact*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 540236.
122. Zou, P., et al., *IDH1/IDH2 mutations define the prognosis and molecular profiles of patients with gliomas: a meta-analysis*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68782.
123. Guo, C., et al., *Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas: mechanisms, biomarkers and therapeutic target*. Curr Opin Neurol, 2011. **24**(6): p. 648-52.
124. Dubbink, H.J., et al., *IDH1 mutations in low-grade astrocytomas predict survival but not response to temozolomide*. Neurology, 2009. **73**(21): p. 1792-5.
125. Mukasa, A., et al., *Significance of IDH mutations varies with tumor histology, grade, and genetics in Japanese glioma patients*. Cancer Sci, 2012. **103**(3): p. 587-92.
126. Houillier, C., et al., *IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas*. Neurology, 2010. **75**(17): p. 1560-6.
127. Rohle, D., et al., *An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells*. Science, 2013. **340**(6132): p. 626-30.
128. Cairncross, J.G., et al., *Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(19): p. 1473-9.
129. Bello, M.J., et al., *Allelic loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors*. Int J Cancer, 1995. **64**(3): p. 207-10.
130. Boots-Sprenger, S.H., et al., *Significance of complete 1p/19q co-deletion, IDH1 mutation and MGMT promoter methylation in gliomas: use with caution*. Mod Pathol, 2013. **26**(7): p. 922-9.
131. Gravendeel, L.A., et al., *Segregation of non-p.R132H mutations in IDH1 in distinct molecular subtypes of glioma*. Hum Mutat, 2010. **31**(3): p. E1186-99.
132. Griffin, C.A., et al., *Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(10): p. 988-94.
133. McDonald, J.M., et al., *The prognostic impact of histology and 1p/19q status in anaplastic oligodendroglial tumors*. Cancer, 2005. **104**(7): p. 1468-77.
134. Kanner, A.A., et al., *The impact of genotype on outcome in oligodendroglioma: validation of the loss of chromosome arm 1p as an important factor in clinical decision making*. J Neurosurg, 2006. **104**(4): p. 542-50.
135. Mariani, L., et al., *Loss of heterozygosity 1p36 and 19q13 is a prognostic factor for overall survival in patients with diffuse WHO grade 2 gliomas treated without chemotherapy*. J Clin Oncol, 2006. **24**(29): p. 4758-63.

136. Felsberg, J., et al., *Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival*. Brain Pathol, 2004. **14**(2): p. 121-30.
137. Kujas, M., et al., *Chromosome 1p loss: a favorable prognostic factor in low-grade gliomas*. Ann Neurol, 2005. **58**(2): p. 322-6.
138. Goze, C., et al., *1P19Q loss but not IDH1 mutations influences WHO grade II gliomas spontaneous growth*. J Neurooncol, 2012. **108**(1): p. 69-75.
139. Jiao, Y., et al., *DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors*. Science, 2011. **331**(6021): p. 1199-203.
140. Schwartzentruber, J., et al., *Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma*. Nature, 2012. **482**(7384): p. 226-31.
141. Wiestler, B., et al., *ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis*. Acta Neuropathol, 2013. **126**(3): p. 443-51.
142. Abedalthagafi, M., et al., *The alternative lengthening of telomere phenotype is significantly associated with loss of ATRX expression in high-grade pediatric and adult astrocytomas: a multi-institutional study of 214 astrocytomas*. Mod Pathol, 2013. **26**(11): p. 1425-32.
143. Reuss, D.E., et al., *ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an "integrated" diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma*. Acta Neuropathol, 2015. **129**(1): p. 133-46.
144. Labussiere, M., et al., *TERT promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations*. Br J Cancer, 2014. **111**(10): p. 2024-32.
145. Killela, P.J., et al., *TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(15): p. 6021-6.
146. Cai, J., et al., *ATRX mRNA expression combined with IDH1/2 mutational status and Ki-67 expression refines the molecular classification of astrocytic tumors: evidence from the whole transcriptome sequencing of 169 samples*. Oncotarget, 2014. **5**(9): p. 2551-61.
147. Jiao, Y., et al., *Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas*. Oncotarget, 2012. **3**(7): p. 709-22.
148. Louis, D.N., *The p53 gene and protein in human brain tumors*. J Neuropathol Exp Neurol, 1994. **53**(1): p. 11-21.
149. von Deimling, A., et al., *p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma*. Cancer Res, 1992. **52**(10): p. 2987-90.
150. Kyritsis, A.P., et al., *Correlation of p53 immunoreactivity and sequencing in patients with glioma*. Mol Carcinog, 1996. **15**(1): p. 1-4.
151. Stander, M., et al., *Prognostic impact of TP53 mutation status for adult patients with supratentorial World Health Organization Grade II astrocytoma or oligoastrocytoma: a long-term analysis*. Cancer, 2004. **101**(5): p. 1028-35.
152. Levidou, G., et al., *P53 immunoexpression as a prognostic marker for human astrocytomas: a meta-analysis and review of the literature*. J Neurooncol, 2010. **100**(3): p. 363-71.
153. Jarvela, S., et al., *Amplification of the epidermal growth factor receptor in astrocytic tumours by chromogenic in situ hybridization: association with clinicopathological features and patient survival*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2006. **32**(4): p. 441-50.
154. Diedrich, U., et al., *Distribution of epidermal growth factor receptor gene amplification in brain tumours and correlation to prognosis*. J Neurol, 1995. **242**(10): p. 683-8.
155. Kleihues, P. and H. Ohgaki, *Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis*. Neuro Oncol, 1999. **1**(1): p. 44-51.
156. Watanabe, K., et al., *Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas*. Brain Pathol, 1996. **6**(3): p. 217-23; discussion 23-4.

157. Wrensch, M., et al., *Serum IgE, tumor epidermal growth factor receptor expression, and inherited polymorphisms associated with glioma survival*. *Cancer Res*, 2006. **66**(8): p. 4531-41.
158. Liu, L., et al., *Clinical significance of EGFR amplification and the aberrant EGFRvIII transcript in conventionally treated astrocytic gliomas*. *J Mol Med (Berl)*, 2005. **83**(11): p. 917-26.
159. Batchelor, T.T., et al., *Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(1 Pt 1): p. 228-33.
160. Korshunov, A., R. Sycheva, and A. Golanov, *The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age < 50 years*. *Cancer*, 2005. **104**(4): p. 825-32.
161. Gan, H.K., A.H. Kaye, and R.B. Luwor, *The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme*. *J Clin Neurosci*, 2009. **16**(6): p. 748-54.
162. Feldkamp, M.M., et al., *Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens*. *Neurosurgery*, 1999. **45**(6): p. 1442-53.
163. Baselga, J., *Targeting the epidermal growth factor receptor: a clinical reality*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(18 Suppl): p. 41S-44S.
164. Jungbluth, A.A., et al., *A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(2): p. 639-44.
165. Sampson, J.H., et al., *Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(13): p. 7503-8.
166. Quang, T.S. and L.W. Brady, *Radioimmunotherapy as a novel treatment regimen: 125I-labeled monoclonal antibody 425 in the treatment of high-grade brain gliomas*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004. **58**(3): p. 972-5.
167. Han, Y., et al., *Preferential inhibition of glioblastoma cells with wild-type epidermal growth factor receptors by a novel tyrosine kinase inhibitor ethyl-2,5-dihydroxycinnamate*. *Oncol Res*, 1997. **9**(11-12): p. 581-7.
168. Everhard, S., et al., *MGMT methylation: a marker of response to temozolomide in low-grade gliomas*. *Ann Neurol*, 2006. **60**(6): p. 740-3.
169. Bleeker, F.E., R.J. Molenaar, and S. Leenstra, *Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma*. *J Neurooncol*, 2012. **108**(1): p. 11-27.
170. Weller, M., et al., *MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?* *Nat Rev Neurol*, 2010. **6**(1): p. 39-51.
171. Olson, R.A., P.K. Brastianos, and D.A. Palma, *Prognostic and predictive value of epigenetic silencing of MGMT in patients with high grade gliomas: a systematic review and meta-analysis*. *J Neurooncol*, 2011. **105**(2): p. 325-35.
172. van den Bent, M.J., et al., *MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(35): p. 5881-6.
173. Rivera, A.L., et al., *MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma*. *Neuro Oncol*, 2010. **12**(2): p. 116-21.
174. Pegg, A.E., M.E. Dolan, and R.C. Moschel, *Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1995. **51**: p. 167-223.
175. Preusser, M., et al., *Prognostic value of Ki67 index in anaplastic oligodendroglial tumours--a translational study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group*. *Histopathology*, 2012. **60**(6): p. 885-94.
176. Moskowitz, S.I., T. Jin, and R.A. Prayson, *Role of MIB1 in predicting survival in patients with glioblastomas*. *J Neurooncol*, 2006. **76**(2): p. 193-200.
177. Berghoff, A.S., et al., *Clinical neuropathology practice guide 3-2013: levels of evidence and clinical utility of prognostic and predictive candidate brain tumor biomarkers*. *Clin Neuropathol*, 2013. **32**(3): p. 148-58.

178. Colman, H., et al., *Assessment and prognostic significance of mitotic index using the mitosis marker phospho-histone H3 in low and intermediate-grade infiltrating astrocytomas*. Am J Surg Pathol, 2006. **30**(5): p. 657-64.
179. Habberstad, A.H., S. Gulati, and S.H. Torp, *Evaluation of the proliferation markers Ki-67/MIB-1, mitotin, survivin, pHH3, and DNA topoisomerase IIalpha in human anaplastic astrocytomas--an immunohistochemical study*. Diagn Pathol, 2011. **6**: p. 43.
180. Fuller, G.N., et al., *Reactivation of insulin-like growth factor binding protein 2 expression in glioblastoma multiforme: a revelation by parallel gene expression profiling*. Cancer Res, 1999. **59**(17): p. 4228-32.
181. Karcher, S., et al., *Different angiogenic phenotypes in primary and secondary glioblastomas*. Int J Cancer, 2006. **118**(9): p. 2182-9.
182. Kim, S., et al., *Identification of combination gene sets for glioma classification*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(13): p. 1229-36.
183. Liang, Y., et al., *Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(16): p. 5814-9.
184. Rickman, D.S., et al., *Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis*. Cancer Res, 2001. **61**(18): p. 6885-91.
185. Sallinen, S.L., et al., *Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques*. Cancer Res, 2000. **60**(23): p. 6617-22.
186. Shai, R., et al., *Gene expression profiling identifies molecular subtypes of gliomas*. Oncogene, 2003. **22**(31): p. 4918-23.
187. Tanwar, M.K., M.R. Gilbert, and E.C. Holland, *Gene expression microarray analysis reveals YKL-40 to be a potential serum marker for malignant character in human glioma*. Cancer Res, 2002. **62**(15): p. 4364-8.
188. Tso, C.L., et al., *Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups*. Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 159-67.
189. Sahm, F., et al., *Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma*. Acta Neuropathol, 2014. **128**(4): p. 551-9.
190. Liu, X.Y., et al., *Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations*. Acta Neuropathol, 2012. **124**(5): p. 615-25.
191. Louis, D.N., et al., *International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading*. Brain Pathol, 2014. **24**(5): p. 429-35.